

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 7 月 22 日 (22.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/061101 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 9/14, C12Q 1/34, 1/68,  
1/02, A61K 45/00, A61P 37/06, 43/00

〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番  
7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016895

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044  
大阪府 大阪市 中央区伏見町四丁目 2 番 1 4 号 藤村  
大和生命ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-378800  
2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢  
薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL  
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区  
道修町 3 丁目 4 番 7 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,  
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特  
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ  
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松岡 秀明 (MAT-  
SUOKA, Hideaki) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中  
央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社  
内 Osaka (JP). 藤村 高穂 (FUJIMURA, Takao) [JP/JP];  
〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番  
7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 林 雅子  
(HAYASHI, Masako) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市  
中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会  
社内 Osaka (JP). 荒森 一朗 (ARAMORI, Ichiro) [JP/JP];

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/061101 A1

(54) Title: METHOD OF SELECTING NOVEL IMMUNOSUPPRESSANT

(54) 発明の名称: 新規免疫抑制剤の選択方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of selecting an IL-2 production inhibitor and/or an immunocompetent cell prolif-  
eration inhibitor with little GATA-1 production inhibitory activity which comprises measuring the HDAC4 and/or HDAC8 inhibitory  
activity of a test substance; and a method of selecting an immunosuppressant with little platelet-reducing effect which comprises  
measuring the HDAC4 and/or HDAC8 inhibitory activity of a test HDAC inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、被験物質の HDAC4 及び/又は HDAC8 阻害活性を測定することを含む、GATA-1 産生阻害活性の  
少ない IL-2 産生阻害剤及び/又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法、および被験 HDAC 阻害剤の HDAC4 及び/又  
は HDAC8 阻害活性を測定することを含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法を提供する。

BEST AVAILABLE COPY

## 明細書

## 新規免疫抑制剤の選択方法

## 技術分野

- 5 本発明は、HDAC4 及び／又は HDAC8 のみを選択的に抑制することを特徴とする血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤を選択する方法、当該方法によって得られる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤又は GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞
- 10 増殖阻害剤、当該方法に使用されるキット等に関する。

## 背景技術

- 今日、臓器移植後の急性拒絶反応を抑制する為に臨床現場で広く用いられている主要な免疫抑制剤であるシクロスポリン A (Cyclosporin A, CsA) 及びタクロリムス (FK506) は、それぞれに特異的なイミュノフィリン (immunophilins: 例えば CsA の場合には cyclophilin, FK506 の場合は、FKBP12) との結合を通じて、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンの活性を阻害する。その結果、NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cell) の脱リン酸化反応が阻害
- 15 されることによって、NF-AT の核内移行が阻害され、IL-2 遺伝子の転写活性が抑制されることが知られている。このような作用メカニズムの研究から、活性化された T 細胞において IL-2 遺伝子の転写レベルでの発現が特異的に抑制されることが、臓器移植片の拒絶を抑制し、様々な自己免疫疾患等への治療効果を示す上で、極めて重要であることが明らかに
- 20 になっている。
- 25

ところで、真核生物の細胞核 DNA はヌクレオソームを単位構造体としたクロマチン構造を形成し、階層的に折りたたまれている。一個のヌクレオソームには、H2A, H2B, H3, H4 の各ヒストンがそれぞれ 2 分子と H1 ヒストン 1 分子が含まれている。これらのヒストン蛋白質の N-末端側に存在する特定のリジン残基は、しばしばアセチル化の修飾を受け、様々な遺伝子の発現調節に関連していることが知られている。

ヒストン N 末端側のアセチル化のレベルは、相反する 2 系統の酵素、すなわちヒストンアセチルトランスフェラーゼ（ヒストンアセチル化酵素, histone acetyltransferase, HAT）と ヒストンデアセチラーゼ（ヒストン脱アセチル化酵素, histone deacetylase, 以下、必要に応じて HDAC と省略する）の活性のバランスによって精妙に制御されている。このうち、ヒストンデアセチラーゼは、活性中心に亜鉛を配位する金属酵素で、アセチル化されたヒストンからアセチル基を除去する機能を担っており、このようなアセチル基の除去により、クロマチン構造の凝集が生じ、転写抑制につながると考えられている。

ヒトのヒストンデアセチラーゼは、一連の研究から、これまでに HDAC1 から HDAC11 まで、少なくとも 11 種類のアイソフォーム (isoform) の存在が知られている (例えば、Pandey R et al., Nucleic Acids Research, 30(23): 5036-55 (2002); L. Gao et al., Journal of Biological Chemistry, 277(28): 25748-25755 (2002); Joseph J. BUGGY et al., Biochemical Journal, 350: 199-205 (2000); 国際公開第 WO 00/10583 号を参照)。そして、それらの各々のアイソフォームは、単体の酵素として機能している訳ではなく、実際には他の多くの蛋白質と相互作用し、より大きな複合体を構成していることが判明している。それらの HDAC アイソフォームのうち、HDAC1, HDAC2, HDAC3, 及び HDAC8 は、構造的に酵母の Rpd3 蛋白質と高い相同性を有しており、クラス I に分類され

ている。HDAC1 や HDAC2 は、多数のサブユニット構造を含む複合体の構成要素の一種であり、例えば SIN3 複合体や NURD/Mi2 複合体の中に見いだされる。HDAC3 は、N-CoR (nuclear receptor corepressor) や SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid) と複合体を形成し、例えば thyroid hormone receptor (TR) や v-ErbA による転写抑制を仲介することが知られている。一方、酵母の Hda1 蛋白質に相同性を示す酵素群は、クラス II に分類され、HDAC4, HDAC5, HDAC6, 及び HDAC7 がこのグループに属することが知られている。クラス II のヒストンデアセチラーゼである HDAC4, HDAC5 や HDAC7 は、N-CoR, SMRT や BCL-6 による抑制を仲介する付加的なコレプレッサーである BCoR と相互作用し得ることが知られている。

組換え体の HDAC3 は、単体としてはそれ自体不活性であるが、SMRT や N-CoR を添加することによって活性ある酵素として機能し得ることを示唆するデータが報告されている (例えば、Matthew G. Guenther et al., Molecular and Cellular Biology, 21(18): 6091-6101 (2001) 参照) また、クラス II 酵素である HDAC4 は、生体内では、SMRT や N-CoR を介してクラス I 酵素である HDAC3 と相互作用することが報告されている (例えば、Wolfgang Fischie et al., Molecular Cell, 9: 45-57 (2002) 参照)。しかしながら、これらの HDAC アイソフォームが活性化される正確なメカニズムについては、未だ不明の点も多い。

これまで、精力的なスクリーニングによって HDAC 阻害活性を示す化合物が数多く得られているが、それらの中には顕著な IL-2 の産生阻害活性を示す化合物が含まれており (例えば、I. Takahashi et al., The Journal of Antibiotics, 49: 453-457 (1995) 参照)、シクロスポリンやタクロリムスを補完する免疫抑制剤の候補として注目されている。実際、このようにして選択された化合物の中にはインビボ (in vivo) において優れた



免疫抑制作用を示すものが見出されている。FR225497 は、その強力な免疫抑制作用によって、臓器移植片拒絶(organ transplant rejection)、自己免疫疾患(autoimmune diseases)の治療剤や予防剤として優れた効果を示すことが見出されているが(例えば、国際公開第 WO 00/08048 号参照)、それに加えて、遺伝子発現の異常によって発症すると考えられている他の数多くの疾患の治療剤や予防剤としての有用性も示唆されている。それらの疾患の中には、例えば、炎症性疾患(inflammatory disorders)、糖尿病(diabetes)、糖尿病性合併症(diabetic complications)、ホモ接合型サラセミア(homozygous thalassemia)、繊維症(fibrosis)、肝硬変(cirrhosis)、急性前骨髄球性白血病(acute promyelocytic leukaemia, APL)、原虫感染症(protozoal infection)、癌(tumor)などが含まれる。しかしながら、このような有用性にもかかわらず、これらの HDAC 阻害活性を示す化合物の多くは、生体に投与した場合に、重篤な血小板減少の副作用を生じやすいという問題点があり、実際の治療薬としての利用を困難にしていた。

免疫抑制活性を示す HDAC 阻害剤の多くが血小板減少の副作用を生じやすい原因については、現在のところ、まだ十分に解明されているわけではない。しかしながら、本発明者らは以前に、HDAC 阻害剤の重篤な副作用である血小板減少作用については、GATA-1(GATA-1 binding protein, GF-1, NF-E1,あるいは Eryf 1 とも呼ばれている)遺伝子の発現抑制が深く関わっていること、及び血小板抑制作用の強い化合物ほど GATA-1 遺伝子の転写を強く抑制する傾向にあることを明らかにしている(特願 2002-203901 参照)。

GATA-1 は、造血系遺伝子の転写制御領域に特徴的に存在する (A/T)GATA(A/G) コンセンサス配列を認識する DNA 結合蛋白質である。この GATA モチーフ配列は、各種グロビン遺伝子のエンハンサー領域、 $\beta$ -

グロビン遺伝子のローカス制御領域 (locus control regions, LCRs)、T  
細胞受容体  $\alpha$ -鎖、 $\delta$ -鎖遺伝子のエンハンサー領域などの様々な制御領  
域やプロモーターで見出されている。また、GATA-1 mRNA は、成熟赤血  
球細胞・マスト細胞・巨核球などで高発現しており、多機能性前駆細胞  
5 や若齢マウスの精巣にもわずかに発現が見られる。さらに、GATA-1 遺伝  
子を通常の方法でノックアウトしたマウスは、1 次造血細胞の形成障害  
から胚発生の段階で致死的となる (例えば、Y. Fujiwara et al.,  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 93:  
12355-12358 (1996) 参照)。一方、巨核球系列の GATA-1 遺伝子発現だけ  
10 を選択的にノックアウトさせたマウスを作製することは可能であり、こ  
のようなマウスにおいては、血小板数が激減し、巨核球系細胞の正常な  
成熟も見られないことが判明している (例えば、R. A. Shivdasani et al.  
The EMBO Journal, 16: 3965-3973 (1997) 参照)。

HDAC には、数多くのアイソザイムが存在するが、それらの中には、阻  
15 害されると生体にとって重篤な副作用を生じるものがある。例えば、従  
来のアイソザイム選択性のない HDAC 阻害剤の投与によって、血小板減少  
の副作用が生じるが、本発明者らは、この作用が、赤血球系や巨核球系  
の細胞分化や成熟に決定的な役割を果たしている GATA-1 遺伝子の転写  
抑制作用によってもたらされている可能性を明らかにしており、これを  
20 利用して、血小板減少作用が少ない免疫抑制剤をスクリーニングする方  
法を以前に提供している (特願 2002-203901 参照)。しかし、このスクリ  
ーニング方法では、血小板減少作用が少ない免疫抑制剤をスクリーニン  
グするために、HDAC 阻害作用を有する化合物をスクリーニングした後に、  
血小板抑制作用を別途評価する必要がある、労力及び時間を要すること  
25 となっていたため必ずしも満足できるものではなかった。従って、HDAC  
阻害剤の中から免疫抑制剤を選択するには、免疫抑制効果にかかわる特

定のアイソザイムは阻害するが、血小板減少作用等の副作用にかかわる他のアイソザイムを阻害しないものを簡便かつ短時間でスクリーニングする為の優れた方法を提供することが強く求められており、本発明はこのような課題の解決をその目的とするものである。

5

#### 発明の開示

本発明者らは、IL-2 遺伝子及び GATA-1 遺伝子の転写抑制活性と各種 HDAC との関連について鋭意研究する中で、各種 HDAC のうち HDAC4 及び HDAC8 のいずれか 1 つ、もしくはその両方を選択的に抑制すれば、GATA-1 10 産生阻害活性をあまり抑制せずに IL-2 産生を阻害できること、免疫担当細胞の増殖を阻害できること、及び血小板数をあまり減少させずに免疫を抑制できることを発見した。また、本発明者らは、HDAC4 が N-CoR と複合体を形成すること、HDAC4 と N-CoR との複合体がさらに HDAC3 と複合体を形成することを確認した。従って、GATA-1 産生阻害活性の少ない 15 IL-2 産生阻害剤、免疫担当細胞増殖阻害剤、又は血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を得るためには、各種 HDAC のうち HDAC4 及び／又は HDAC8 のみを選択的に抑制する化合物を選択すればよいこと、並びに HDAC4 と N-CoR との複合体の形成、必要に応じて、HDAC4 と N-CoR・HDAC3 複合体との高次複合体の形成を阻害すればよいことを着想し、本発明を完成するに至った。 20

すなわち、本発明は、以下の発明に関する。

《1》HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤。

《2》HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。 25

《3》 GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であって、被験物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定することを含む選択方法。

《4》 血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定することを含む選択方法。

《5》 以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法：

- (i) 被験物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定する、
- 10 (i i) 被検物質の HDAC 酵素阻害活性を測定する、ここで、該 HDAC 酵素阻害活性が、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6 又は HDAC7 酵素阻害活性からなる群より選択される 1 以上の HDAC 酵素阻害活性である。

《6》 以下 (i) ~ (i i i) の工程を含む、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であって、該 IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤が HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、《3》記載の方法：

- (i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8 の各遺伝子を発現させて、酵素液を得る；
- 20 (i i) 当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定する；
- (i i i) HDAC4 遺伝子又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に HDAC 酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

《7》以下(i)～(iii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤がHDAC4及び／又はHDAC8酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、《4》記載の方法：

(i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8の各  
5 遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(ii) 当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定する；

(iii) HDAC4遺伝子又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的にHDAC酵素活性を抑制する被験  
10 物質を選択する。

《8》以下(i)～(iii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤がHDAC4及び／又はHDAC8酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、《4》記載の方法：

(i) ヒト細胞から部分精製された酵素液を被験物質と共存させ、HDAC  
15 酵素活性を測定する；

(ii) HDAC4遺伝子及び／又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を被験物質と共存させ、HDAC酵素活性を測定する；

(iii) (i)と(ii)との酵素活性を比較し、HDAC4遺伝子及び／又はHDAC8遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合  
20 にのみ選択的にHDAC酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

《9》以下(i)～(iii)の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験HDAC阻害剤のうち、HDAC4とN-CoRとの複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする、方法：

25 (i) HDAC4遺伝子及びN-CoR遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(ii) 当該酵素液を被験HDAC阻害剤と共存させる；

(i i i) (i i) で得られた酵素液と被験 HDAC 阻害剤の混合液において HDAC4 と N-CoR との複合体が形成されているか否かを解析する。

- 《10》以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 蛋白質の少なくとも一部を含む HDAC4 融合蛋白質と、N-CoR 蛋白質の少なくとも一部を含む N-CoR 融合蛋白質との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法：

(i) 該 HDAC4 融合蛋白質をコードする遺伝子、及び N-CoR 融合蛋白質をコードする遺伝子を細胞内で発現させる；

- 10 (i i) 被験 HDAC 阻害剤が、該 HDAC4 融合蛋白質と該 N-CoR 融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かを解析する。

《11》以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 及び／又は HDAC8 の発現量を抑制するものを選択することによる

- 15 方法：

(i) HDAC4 及び／又は HDAC8 を発現する細胞と被験 HDAC 阻害剤を共存させる；

(i i) 当該細胞における HDAC4 及び／又は HDAC8 発現量を測定する。

- 《12》以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 及び／又は HDAC8 と HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドとの結合を選択的に阻害するものを選択することによる、方法：

(i) HDAC4 及び／又は HDAC8 遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

- 25 (i i) 当該酵素液を HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドと被験 HDAC 阻害剤と共存させ、HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素と HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドとの結合活性を測定する。

《13》以下 (i) (ii) を少なくとも含む、HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット：

(i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6、HDAC7 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液；

(ii) HDAC4 及び／又は HDAC8 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液；

《14》配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA。

《15》配列番号4又は配列番号6に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする HDAC4 変異体。

《16》有効量の HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を被験体（例えば任意の動物、好ましくは哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ等）、最も好ましくはヒト）に投与する工程を含む、GATA-1 産生阻害活性が少ない IL-2 産生及び／又は免疫担当細胞増殖の阻害方法。

《17》有効量の HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を被験体（上記と同様）に投与する工程を含む、血小板減少作用が少ない免疫の抑制方法。

《18》GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤の製造のための HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤の使用。

《19》血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の製造のための HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤の使用。

図 1 は、P C Rによって増幅したヒト IL-2 プロモーター領域における 731 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 X00695 (全長 6684bp)より入手し、その一部 (配列番号 2 9) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 1 で作製された pGL3 IL2 pro に含まれる IL-2 プロモーター領域の塩基配列 (配列番号 2 3) である。

図 2 は、P C Rによって増幅したヒト IL-2 プロモーター領域における 368 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 X00695 (全長 6684bp)より入手し、その一部 (配列番号 3 1) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 1 で作製された pGL3 IL2 pro43 に含まれる IL-2 プロモーター領域の塩基配列 (配列番号 2 4) である。

図 3 は、P C Rによって増幅したヒト GATA-1 プロモーター領域における 821 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 AF196971 (全長 113853bp)より入手し、その一部 (配列番号 8 4) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 2 で作製された pGL3-IE に含まれる GATA-1 プロモーター領域の塩基配列、及び pGL3-HSI-IE Pro に含まれる GATA-1 プロモーター領域の一部の塩基配列 (配列番号 2 5) である。

図 4 は、P C Rによって増幅したヒト GATA-1 プロモーター領域における 637 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 AF196971 (全長 113853bp)より入手し、その一部 (配列番号 8 5) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 2 で作製された pGL3-HSI-IE Pro に含まれる GATA-1 プロモーター領域の一部の塩基配列 (配列番号 2 6) である。



図 1 は、P C R によって増幅したヒト IL-2 プロモーター領域における 731 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 X00695 (全長 6684bp) より入手し、その一部 (配列番号 2 9) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 1 で作製された pGL3 IL2 pro に含まれる IL-2 プロモーター領域の塩基配列 (配列番号 2 3) である。

図 2 は、P C R によって増幅したヒト IL-2 プロモーター領域における 368 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 X00695 (全長 6684bp) より入手し、その一部 (配列番号 3 1) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 1 で作製された pGL3 IL2 pro43 に含まれる IL-2 プロモーター領域の塩基配列 (配列番号 2 4) である。

図 3 は、P C R によって増幅したヒト GATA-1 プロモーター領域における 821 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 AF196971 (全長 113853bp) より入手し、その一部 (配列番号 8 4) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 2 で作製された pGL3-IE に含まれる GATA-1 プロモーター領域の塩基配列、及び pGL3-HSI-IE Pro に含まれる GATA-1 プロモーター領域の一部の塩基配列 (配列番号 2 5) である。

図 4 は、P C R によって増幅したヒト GATA-1 プロモーター領域における 637 塩基対断片の塩基配列の確認結果を示す。上段の塩基配列は、GenBank の accession 番号 AF196971 (全長 113853bp) より入手し、その一部 (配列番号 8 5) を比較対照とした。下段の塩基配列は、実施例 2 で作製された pGL3-HSI-IE Pro に含まれる GATA-1 プロモーター領域の一部の塩基配列 (配列番号 2 6) である。

図 5 は、IL-2 転写活性（上段、 $n = 3$ ）及び細胞増殖度（下段）に関する各種 HDAC アインザイム過剰発現の影響を示す。

図 6 は、GATA-1 転写活性に対する各種 HDAC アインザイム過剰発現の影響（ $n = 2$ ）を示す。

- 5 図 7 は、実施例 6 において作製された HDAC4 ドミナントネガティブ変異体の概要を示す。

図 8 は、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体（H802K H803L, H863L）の発現量依存的な IL-2 転写抑制を示す。各グラフの上の記載は、トランスフェクションに使用したプラスミド量（ $n = 3$ ）を示す。

- 10 図 9 は、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体発現（H863L）による Jurkat 細胞特異的な細胞増殖阻害を示す。

- 図 10 は、Jurkat 細胞及び HEL 細胞における HDAC4 ドミナントネガティブ変異体（H802K H803L, H863L）発現による IL-2 及び GATA-1 転写に対する影響を示す。上の図は、正常な HDAC1、HDAC3、HDAC4 及びそれら  
15 の変異体に関しての、Jurkat 細胞での IL-2 レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。下の図は、正常な HDAC1、HDAC3、HDAC4 及びそれらの変異体に関しての、HEL 細胞での GATA-1 レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。

- 図 11 は、PEAK Rapid 細胞（Edge BioSystems）における HDAC4, HDAC5, HDAC7 の発現、並びに HDAC4, HDAC5, HDAC7 が N-CoR 及び HDAC3 と複合  
20 体を形成していることを示す。

図 12 は、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体（H863L）の複合体形成能について示す。

- 図 13 は、野生型 HDAC4 及び HDAC4 ドミナントネガティブ変異体（H802K  
25 H803L, H863L）における HDAC 活性を示す。

図 1 4 は、ツーハイブリッドシステムによる HDAC-4 と N-CoR との相互作用の概要を示す。上の図は、HDAC-4 と N-CoR とが相互作用する場合の転写調節の様式を示し、下の図は、HDAC-4 と N-CoR とが相互作用しない場合の転写調節の様式を示す。

- 5 図 1 5 は、ツーハイブリッドシステムによる HDAC-4 と N-CoR との相互作用を示す。

- 図 1 6 は、Jurkat 細胞及び HEL 細胞における HDAC4 特異的 siRNA による IL-2 及び GATA-1 転写に対する影響を示す。左の図は、HDAC4 特異的 siRNA に関しての、Jurkat 細胞での IL-2 レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。右の図は、HDAC4 特異的 siRNA に関しての、HEL 細胞での GATA-1  
10 レポーター遺伝子アッセイの結果を示す。

#### 発明の詳細な説明

以下に、本発明について詳細に説明する。

- 15 本発明は、HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤に関する。HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤は、例えば、後述する選択方法により入手することができる。また、後述する選  
20 択方法を当該分野で公知の方法と組み合わせて、HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤を入手することもできる。

- 「HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤」とは、HDAC1～3 及び HDAC5  
～ 7 の HDAC 酵素活性を抑制するよりも、HDAC4 及び／又は HDAC8 の HDAC  
25 酵素活性をより抑制するものをいうが、HDAC1～3 及び HDAC5～7 の HDAC 酵素活性を抑制しないか又は実質的に抑制せず、かつ HDAC4 及び／又は

HDAC8 の HDAC 酵素活性を抑制するものが好ましい。HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤としては、例えば、HDAC4 及び／又は HDAC8 に特異的なアンチセンス核酸、リボザイム、デコイ核酸、s i R N A 及び抗体（例えば、単鎖抗体）、HDAC4 及び／又は HDAC8 のドミナントネガティブ変異体、これらをコードする核酸を含む発現ベクター、並びに後述の選択方法により得られる物質が挙げられる。

「GATA-1 産生阻害活性」とは、GATA-1 産生を抑制する活性である限り如何なる活性であってもよい。GATA-1 産生抑制の機序としては、例えば、転写レベルでの抑制、GATA-1 mRNA 分解の促進、翻訳レベルでの抑制等が挙げられる。GATA-1 産生阻害活性は、当該分野で公知の方法により評価することができる。具体的には、GATA-1 産生阻害活性は、後述するように GATA-1 レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイにより、又は GATA-1 を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等において GATA-1 mRNA 若しくは GATA-1 蛋白質の発現量を測定して、評価することができる。また、ある化合物を添加して評価した際の GATA-1 産生阻害活性が「少ない」とは、GATA-1 産生を阻害する活性が比較対照とする化合物を添加した場合に比べて低いことをいい、例えば、当該 GATA-1 産生阻害活性が少ないか否かは、GATA-1 レポーター遺伝子を用いるアッセイにより評価することができる。比較対照する化合物としては、例えば、非特異的な HDAC 阻害剤であるトリコスタチン（tricostatin, T S A）が挙げられる。

「免疫担当細胞増殖阻害剤」とは、免疫担当細胞の増殖を阻害する活性を有するものである限り如何なる種類の活性を有するものであってもよい。細胞の増殖阻害の機序としては、例えば、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導等が挙げられる。免疫担当細胞の増殖阻害活性は、当該分野で公知の方法により評価することができる。具体的には、チミジンの

取り込み活性、MTT法等により評価することができる。ここで、「免疫担当細胞」とは、生体において免疫機能を担う細胞をいう。好ましくは、「免疫担当細胞」とは、抗体の産生能あるいは細胞性免疫反応を発現する能力を有するリンパ球や樹状細胞等をいい、より好ましくはT細胞をいう。

「IL-2 産生阻害剤」とは、IL-2 産生阻害活性、即ち、IL-2 産生を抑制する活性を有するものである限り如何なる種類の活性を有するものであってもよい。IL-2 産生阻害の機序としては、例えば、転写レベルでの抑制、IL-2 mRNA 分解の促進、翻訳レベルでの抑制等が挙げられる。IL-2 産生阻害活性は、当該分野で公知の方法により評価することができる。具体的には、IL-2 産生阻害活性は、後述する実施例に記載されたようにIL-2 レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイにより、又はIL-2 を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等においてIL-2 mRNA 若しくはIL-2 蛋白質の発現量を測定して、評価することができる。

また、本発明は、HDAC4 及び／又はHDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤に関する。HDAC4 及び／又はHDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤は、例えば、後述する選択方法により入手することができる。また、後述する選択方法を当該分野で公知の方法と組み合わせて、HDAC4 及び／又はHDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を入手することもできる。

「血小板減少作用」とは、血小板数を低下させる作用をいい、当該血小板減少作用は、例えば、実験動物への化合物の投与等による当該分野で公知の方法によって直接的に確認することができる。また、血小板減少作用とGATA-1 産生阻害活性との間には相関性があることが知られているため、血小板減少作用は、GATA-1 産生阻害活性を指標にして間接的に確認することもできる。また、ある化合物や薬剤について血小板減少

作用の「少ない」とは、当該化合物や当該薬剤をヒトまたは実験動物等に投与した際に、血小板数を減少させる作用が、比較対照とする化合物を投与した場合に比べて低いことをいい、例えば、上述したような方法によって GATA-1 産生阻害活性が少ないか否かを評価することにより、血小板減少作用が少ないか否かを確認することもできる。比較対照する化合物としては、例えば、オキサムフラチン (Oxamflatin) が挙げられる。

「免疫抑制剤」とは、免疫抑制を誘発する薬剤をいい、例えば、当該免疫抑制剤としては、IL-2 産生を抑制する活性を有するものが挙げられる。従って、例えば、上述したような方法を用いて IL-2 転写抑制活性を有するか否かを評価することにより、当該免疫抑制剤を入手することができる。

また、本発明は、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定することを含む選択方法に関する。

具体的には、本発明は、(i) 被検物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定し、(i i) 被検物質の HDAC 酵素阻害活性（ここで、HDAC 酵素阻害活性は、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6 又は HDAC7 酵素阻害活性からなる群より選択される 1 以上の HDAC 酵素阻害活性である）を測定することを含む、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。本方法の工程 (i i) では、被検物質の存在下、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6 又は HDAC7 酵素阻害活性からなる群より選択される 1 以上の HDAC 酵素阻害活性が測定されるが、好ましくは HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6 又は HDAC7 酵素阻害活性の全てが測定される。なお、本方法は、(i i i) (i) と (i

i) との結果に基づき、被検物質が HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素活性を選択的に阻害するか否かを評価する工程をさらに含んでいてもよい。

より具体的には、本発明は、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該 IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤が HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする方法に関する。1 実施態様において、上記方法は、(i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8 の各遺伝子を発現させて、酵素液を得た後に、(i i) 当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定し、(i i i) HDAC4 遺伝子又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に HDAC 酵素活性を抑制する被験物質を選択することを特徴とする。

別の実施態様において、上記方法は、(i) ヒト細胞から部分精製された酵素液を被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定し、(i i) HDAC4 遺伝子及び／又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定し、(i i i) (i) と (i i) との酵素活性を比較し、HDAC4 遺伝子及び／又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に HDAC 酵素活性を抑制する被験物質を選択することを特徴とする。この方法のうち (i) で用いられるヒト細胞としては、ヒト由来の細胞株であれば特に制限されないが、好ましくは、上述の免疫担当細胞に由来する細胞株、最も好ましくは、Jurkat 細胞 (ATCC 受託番号 TIB-152) が用いられる。

上述の「被検物質」としては、本発明の方法による測定系にかけることができる候補物質であれば特に限定されず、低分子有機化合物、低分

子無機化合物、蛋白質や核酸を含む高分子化合物、糖類等のあらゆる化合物を含み、またそれらの混合液、天然物や合成品、動植物や菌類、藻類、微生物からの抽出液の全てを含む。また、「被検物質」としては、例えば、HDAC 阻害剤（例えば、国際公開第 W0 02/085883 号、同第 W0 02/085400 号、同第 W0 02/076941 号、同第 W0 02/062773 号、同第 W0 02/46129 号、  
5 同第 W0 02/07722 号、同第 W0 02/06307 号、同第 W0 01/70675 号、同第 W0 01/38322 号、同第 W0 01/16106 号、同第 W0 00/71703 号、同第 W0 00/21979 号、同第 W0 00/08048 号；公開特許公報 特開 2001-348340、特開平 11-302173；米国特許公開公報 US 2002/0120099、US 2002/0115826；  
10 米国特許第 6,638,530 号、同第 6,541,661 号、同第 6,399,568 号を参照）を使用することができる。なお、「被検物質」は、既知の化合物であっても、新たに発見若しくは合成された化合物であってもよい。

「HDAC 阻害剤」とは、HDAC 酵素活性を阻害する化合物、即ち、HDAC 酵素阻害活性を有する化合物をいう。

15 「HDAC 酵素活性」は、アセチル化された蛋白質、例えば、ヒストンのリジン残基からアセチル基を除去する活性（即ち、脱アセチル化活性）をいい、特定の HDAC アイソザイムによる脱アセチル化活性であっても、不特定の 1 又は 2 以上の HDAC アイソザイムによる脱アセチル化活性であつてもよい。一方、「HDAC4 酵素活性」とは、HDAC4 による脱アセチル  
20 化活性をいい、「HDAC8 酵素活性」とは、HDAC8 による脱アセチル化活性をいう。HDAC1 酵素活性、HDAC2 酵素活性、HDAC3 酵素活性、HDAC4 酵素活性、HDAC5 酵素活性、HDAC6 酵素活性、HDAC7 酵素活性についても同義である。HDAC 酵素活性は、当該分野で公知の方法によって、被検物質の存在下／非存在下、各 HDAC 酵素を含有する酵素液（以下、必要に応じて  
25 「酵素液」と省略する）を HDAC 酵素の基質と反応させることにより測定することができる。



「HDAC 酵素阻害活性」は、蛋白質のリジン残基の脱アセチル化を抑制する活性をいい、特定の HDAC アイソザイムによる脱アセチル化を特異的に抑制する活性であっても非特異的に抑制する活性であってもよい。一方、「HDAC4 酵素阻害活性」とは、HDAC4 による脱アセチル化を抑制する  
5 活性をいい、「HDAC8 酵素阻害活性」とは、HDAC8 による脱アセチル化を抑制する活性をいう。HDAC1 酵素阻害活性、HDAC2 酵素阻害活性、HDAC3 酵素阻害活性、HDAC4 酵素阻害活性、HDAC5 酵素阻害活性、HDAC6 酵素阻害活性、HDAC7 酵素阻害活性についても同義である。

HDAC 酵素活性の測定において使用される基質としては、当該分野で公  
10 知の基質を使用することができるが、代表的には、 $[^3\text{H}]$  アセチル標識ヒストン、蛍光標識アセチル化ペプチド等を使用することができる。例えば、基質として  $[^3\text{H}]$  アセチル標識ヒストンを使用する場合、 $[^3\text{H}]$  アセチル標識ヒストンは、Jurkat 細胞から得ることができる。具体的には、以下の通りである。10% FBS、ペニシリン (50 ユニット/ml) 及びス  
15 トレプトマイシン ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) を補充した RPMI-1640 培地において、 $1 \times 10^8$  の Jurkat 細胞を、5mM 酪酸ナトリウムの存在下、300MBq  $[^3\text{H}]$  酢酸ナトリウムと 30 分間インキュベートし (5%  $\text{CO}_2$ 、37°C)、遠心チューブ (50ml) に回収し、遠心分離 (1000rpm、10 分間) により収集し、リン酸緩衝化生理食塩水で 1 回洗浄する。洗浄した細胞を氷冷した溶解  
20 緩衝液 (10mM Tris-HCl、50mM 亜硫酸水素ナトリウム、1% Triton X-100、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、8.6% スクロース、pH 6.5) 15ml に懸濁する。ダウンスホモジナイゼーション (30 ストローク) 後に、核を遠心分離 (1000rpm、10 分間) により収集し、溶解緩衝液 15ml で 3 回洗浄し、次に氷冷した洗浄緩衝液 (10mM Tris-HCl、13mM EDTA、pH7.4) 15ml で 1 回洗浄する。  
25 ミキサーを使用して、氷冷水 6ml にペレットを懸濁させ、この懸濁液に  $\text{H}_2\text{SO}_4$  68ml を 0.4N の濃度になるように加える。4°C で 1 時間インキュベ

ートした後、懸濁液を遠心分離（15,000rpm、5分間）し、その上清をアセトン 60ml と混合する。最終的に、-20℃で終夜インキュベートした後、凝集物を回収することにより [<sup>3</sup>H] アセチル標識ヒストンを得ることができる。[<sup>3</sup>H] アセチル標識ヒストンを得る方法については、例えば、国際公開第 W000/08048 号、Yoshida, M. et al., J. Biol. Chem., 265: 17174-17179 (1990) 等を参照のこと。このようにして得られた [<sup>3</sup>H] アセチル標識ヒストンは、適当な緩衝液に溶解させそのまま直ぐに用いてもよいし、あるいは直ぐに使用しない場合には、溶液状態で凍結保存しても冷蔵で保存してもよく、又は乾燥させて固体状態で凍結保存しても冷蔵で保存してもよい。

「各遺伝子を発現させる」ことは、プロモーター配列を有する発現ベクターに当該遺伝子を組み込み、当該遺伝子が組み込まれた発現ベクターを細胞に導入して培養すること等によって実施されうる。使用するプロモーター、発現ベクター等は、発現に用いる宿主細胞によって様々に異なるが、通常の専門知識を有する当業者であれば、容易に最適の組合せを市販品の中から見出し得る。あるいは、「各遺伝子を発現させる」ことは、当該遺伝子を SP6 ファージ、T7 ファージ等のプロモーター配列を有する発現ベクターに導入し、in vitro transcription /translation 法により試験管内で反応させることによっても実施されうる。通常の実験知識を有する当業者であれば、この方法により容易に当該各遺伝子の転写産物及び蛋白質を合成することができる。

本発明で使用される遺伝子を細胞に導入する方法としては、リン酸カルシウム法、リポソーム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法（electroporation 法、電気穿孔法）等の当該分野で公知の形質転換方法を用いることができ、特に限定されない。

本発明で使用する遺伝子が導入される細胞としては、特に明記されない限り、発現ベクターに挿入されている遺伝子が発現される細胞であれば限定されず、上述したヒト細胞を含む哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母、大腸菌等を用いることができる。

- 5 「酵素液」とは、HDAC 酵素活性を有する細胞破砕液又は反応液から抽出される HDAC 酵素活性含有画分をいい、HDAC 酵素活性を測定できる程度に HDAC 酵素が精製されているものであれば、HDAC 酵素が部分精製されたものであっても高純度に精製されたものであってもよい。HDAC 酵素活性を有する細胞破砕液は、天然で HDAC 酵素を発現している細胞、または
- 10 は各 HDAC 遺伝子を過剰発現させた細胞から入手することができる。天然で HDAC 酵素を発現している細胞から酵素液を得るためには、例えば、当該細胞を培養し、その培養細胞の破砕液から HDAC 酵素活性を有する画分を抽出すればよい。また、各 HDAC 遺伝子を過剰発現させた細胞から酵素液を得るためには、例えば、各 HDAC 遺伝子を発現ベクターに組み込み、
- 15 該発現ベクターを細胞に導入し、得られた細胞を培養し、その培養細胞の破砕液から HDAC 酵素活性を有する画分を抽出すればよい。一方、HDAC 酵素活性を有する反応液は、例えば、適当なベクターに連結した各 HDAC 遺伝子から、*in vitro* transcription/*in vitro* translation 法を用いて各 HDAC の転写産物及び蛋白質を合成することにより得ることができる。
- 20

- HDAC 酵素の「部分精製」とは、HDAC 酵素活性を測定できる程度に HDAC 酵素を精製することをいい、当該分野で公知の方法、例えば、国際公開第 W000/08048 号、Yoshida, M. et al., *J. Biol. Chem.* 265: p. 17174-17179 (1990) 記載の方法等により行なうことができる。また、
- 25 部分精製された HDAC 酵素を、当該分野で公知の他の精製法によりさらに高純度に精製することもできる。部分精製としては、例えば、以下の精

- 製法を用いることができる。最初に、 $5 \times 10^8$  の Jurkat 細胞を、40ml の H D A 緩衝液（組成：15mM リン酸カリウム、5%グリセロール及び 0.2mM EDTA、pH 7.5）40ml に懸濁する。次いで、懸濁液をホモジナイズした後、遠心分離（35,000 x g, 10 分間）によって核を回収し、得られた核を、
- 5 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を加えた H D A 緩衝液 20ml 中でホモジナイズする。次いで、ホモジネートを超音波処理し、遠心分離（35,000 x g, 10 分間）によって清澄化する。次に、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の濃度を 3.5M まで上昇させることにより、デアセチラーゼを沈殿させる。続いて、沈殿した蛋白質を H D A 緩衝液 10ml に溶解し、それを H D A 緩衝液 4L 中で透析する。透析後のサンプル溶液を、H D A 緩衝液で平衡化した D E A Eーセルロース
- 10 (Whatman DE52) カラム（25×85mm）にロードし、線形勾配（0～0.6M）の NaCl 溶液 300ml により溶出させる。その結果、HDAC 酵素活性は、0.3～0.4M NaCl 溶出画分において単一ピークとして見出される。
- HDAC 酵素活性は、当該分野で公知の方法によって測定される。例えば、
- 15 基質として  $[^3\text{H}]$  アセチル標識ヒストンを使用する場合には、 $[^3\text{H}]$  アセチル標識ヒストン  $10 \mu\text{l}$  を酵素液  $90 \mu\text{l}$  に加え、混合液を  $25^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートする。反応を、塩酸  $10 \mu\text{l}$  を加えることにより停止し、放出された  $[^3\text{H}]$  酢酸を酢酸エチル 1ml で抽出する。最終的に、溶媒層 0.9ml をトルエンシンチレーション溶液に移し、この溶液の放射活
- 20 性を測定することによって、HDAC 酵素活性を測定することができる。被検物質の共存下で各酵素液の HDAC 酵素活性を測定する場合には、被検物質は、 $[^3\text{H}]$  アセチル標識ヒストン  $10 \mu\text{l}$  と酵素液  $90 \mu\text{l}$  との混合液の調製前後に加えて、反応を開始させればよい。なお、HDAC 酵素活性の測定の詳細については、 $[^3\text{H}]$  アセチル標識ヒストンを基質とする場合には、例えば、国際公開第 W000/08048 号；Yoshida, M. et al., J. Biol. Chem.,
- 25

265: 17174-17179 (1990)等、蛍光標識アセチル化ペプチドを基質とする場合には、例えば、国際公開第 W001/040506 号等を参照のこと。

上述した方法では、HDAC4 遺伝子又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に HDAC 酵素活性を抑制する被験物質が好ましくは選択されるが、HDAC1～3 及び HDAC5～7 の HDAC 酵素活性を抑制するよりも HDAC4 及び／又は HDAC8 の HDAC 酵素活性をより抑制する被験物質を選択してもよい。より好ましくは、HDAC1～3 及び HDAC5～7 の HDAC 酵素活性を抑制しないか又は実質的に抑制せず、かつ HDAC4 及び／又は HDAC8 の HDAC 酵素活性を抑制する被験物質が選択される。

また、本発明は、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 と N-CoR との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法に関する。例えば、この方法は、(i) HDAC4 遺伝子及び N-CoR 遺伝子を発現させて、酵素液を得た後に、(i i) 当該酵素液を被験 HDAC 阻害剤と共存させ、(i i i) (i i) で得られた酵素液と被験 HDAC 阻害剤の混合液において HDAC4 と N-CoR との複合体が形成されているか否かを解析することを特徴する。尚、この方法において、HDAC4 遺伝子及び N-CoR 遺伝子に加え、さらに HDAC3 遺伝子を発現させて得られる酵素液を用いてもよい。この場合、被験 HDAC 阻害剤の存在下において、HDAC4 と N-CoR 及び HDAC3 との間で高次複合体を形成しているか否かが解析される。上記方法の (i i i) において、複合体が形成されているか否かを解析する方法としては、例えば、表面プラズモン共鳴を利用した解析法、抗体を利用した解析法（例えば、ウエスタンブロッティング）等の当該分野で公知の方法が挙げられる。

抗体を利用した解析法、例えば、ウェスタンブロッティングにおいて、2次抗体を標識するにあたり使用される標識物質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I等の放射性物質、  
5 化学発光物質等が挙げられる。

また、HDAC4とN-CoRとの複合体形成を特異的に阻害するGATA-1産生阻害活性の少ないIL-2産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤、あるいは血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択するために、当該分野で公知のツーハイブリッドシステムに基づく方法を用いることもできる。  
10 例えば、この目的でツーハイブリッドシステムを用いる場合、(i) HDAC4蛋白質の少なくとも一部を含むHDAC4融合蛋白質をコードする遺伝子、N-CoR蛋白質の少なくとも一部を含むN-CoR融合蛋白質をコードする遺伝子を細胞内で発現させ、(i i) 被験物質（好ましくは、被験HDAC阻害剤）が、HDAC4融合蛋白質とN-CoR融合蛋白質との複合体形成  
15 を阻害するか否かを解析することによって、HDAC4融合蛋白質とN-CoR融合蛋白質との複合体形成を特異的に阻害する被検物質が選択される。

HDAC4融合蛋白質は、HDAC4蛋白質のうち、N-CoRと相互作用する領域を含んでいればよいが、HDAC4蛋白質全体を含んでいてもよい。同様に、N-CoR融合蛋白質は、N-CoR蛋白質のうち、HDAC4と相互作用する領域（例  
20 えば、後述のRD3）を含んでいればよいが、N-CoR蛋白質全体を含んでいてもよい。また、HDAC4融合蛋白質及びN-CoR融合蛋白質は、それぞれ、HDAC4蛋白質及びN-CoR蛋白質の一部又は全てに加え、転写調節因子由来のDNA結合ドメイン（例えば、GAL4 DNA結合ドメインなど）又は転写活性化ドメイン（例えば、VP16活性化ドメインなど）を更に含む。  
25 但し、HDAC4融合蛋白質がDNA結合ドメインを含む場合には、N-CoR融合蛋白質は転写活性化ドメインを含むことが必要とされ、一方、HDAC4融

合蛋白質が転写活性化ドメインを含む場合には、N-CoR 融合蛋白質は DNA 結合ドメインを含むことが必要とされる。

融合蛋白質間で複合体が形成されているか否かは、該融合蛋白質が含む DNA 結合領域が結合するプロモーターの下流にある遺伝子の発現量  
5 により確認することができる。即ち、融合蛋白質間で複合体が形成されている場合には、当該遺伝子によりコードされる mRNA や蛋白質の発現量や、当該遺伝子の上流にあるプロモーターを含むレポーター遺伝子の発現量が増大し、一方、融合蛋白質間で複合体が形成されていない場合には、当該遺伝子がコードする mRNA や蛋白質の発現量や、上記プロモーター  
10 ーを含むレポーター遺伝子の発現量は変動しない。

また、被験物質（好ましくは、被験 HDAC 阻害剤）が、HDAC4 融合蛋白質と N-CoR 融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かは、被検物質を共存させることによつて、該融合蛋白質が含む DNA 結合領域が結合するプロモーターの下流にある遺伝子の発現量が減少するか否かにより評価  
15 することができる。即ち、（a）当該遺伝子によりコードされる mRNA や蛋白質の発現量や当該遺伝子の上流にあるプロモーターを含むレポーター遺伝子の発現量を、被検物質の非共存下で測定し、（b）当該 mRNA、蛋白質又はレポーター遺伝子の発現量を、被検物質の共存下で測定し、（c）（a）の発現量と（b）の発現量とを比較すればよく、（b）の発  
20 現量が（a）の発現量よりも低い場合に、当該被検物質は、HDAC4 融合蛋白質と N-CoR 融合蛋白質との複合体形成を阻害する物質として選択される。なお、被験物質が HDAC4 融合蛋白質と N-CoR 融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かは、アッセイの簡便性、感度等の観点から、好ましくは、レポーター遺伝子の発現量を測定して評価される。

25 また、本発明は、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害活性及び／又は免疫担当細胞増殖阻害活性を有する化合物、又は血小板減少作

用の少ない免疫抑制活性を有する化合物であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 及び／又は HDAC8 の発現量を抑制するものを選択することによる方法に関する。この方法は、(i) HDAC4 及び／又は HDAC8 を発現する細胞と被験 HDAC 阻害剤を共存させ、(ii) 当該細胞における HDAC4  
5 及び／又は HDAC8 発現量を測定することを特徴とする。具体的には、この方法は、後述する GATA-1 mRNA、GATA-1 蛋白質又は GATA-1 レポーター遺伝子の発現量の測定方法と同様の方法によって行なうことができる。

また、本発明は、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害活性を有する化合物、又は血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物  
10 の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 及び／又は HDAC8 と HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドとの結合を選択的に阻害するものを選択する方法に関する。この方法は、(i) HDAC4 及び／又は HDAC8 遺伝子を発現させて、酵素液を得た後に、(ii) 当該酵素液を HDAC4  
15 及び／又は HDAC8 特異的リガンドと被験 HDAC 阻害剤と共存させ、HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素と HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドとの結合活性を測定することを特徴とする。

「HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンド」とは、HDAC4 及び／又は HDAC8 に特異的に結合する物質の中で、HDAC1～3 及び HDAC5～7 よりも HDAC4 及び／又は HDAC8 に対する結合活性がより強い物質をいう。これ  
20 らの物質の中には、各酵素活性を促進するものや逆に阻害するもの等が含まれるが、それらに限定されない。「HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンド」としては、HDAC1～3 及び HDAC5～7 に対する結合活性が弱いか、又は結合活性が実質的に存在せず、かつ HDAC4 及び／又は HDAC8 に対する結合活性が強い低分子物質が好ましい。

25 また、上記方法における工程 (ii) では、「HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンド」が好ましく用いられるが、「HDAC4 及び／又は HDAC8 非



特異的リガンド」も用いることができる。「HDAC4 及び／又は HDAC8 非特異的リガンド」とは、HDAC4 及び／又は HDAC8 に対する結合活性よりも HDAC1～3 及び HDAC5～7 の HDAC に対する結合活性がより強い物質、あるいは HDAC4 及び／又は HDAC8 と HDAC1～3 及び HDAC5～7 への結合活性が  
5 ほぼ同等である物質をいう。本発明において、「HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンド」及び「HDAC4 及び／又は HDAC8 非特異的リガンド」をまとめて「HDAC4 及び／又は HDAC8 リガンド」と呼ぶ場合もある。

上記方法における工程 (i i) では、HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素と HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドとの結合活性が、被験 HDAC 阻害  
10 剤の共存下で測定される。結合活性は、例えば、バインディングアッセイ (binding assay)、質量分析法等の当該分野で公知の方法を用いることにより測定することができる。上記方法により、HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドを競合的に阻害する物質を入手することができる。

本発明では、HDAC4 として、好ましくは、ヒト由来の HDAC4 が用い  
15 られる。具体的には、HDAC4 とは、例えば、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、HDAC 酵素活性を有するものをいう（例えば、GenBank 登録番号 AF132607 の塩基配列がコードする蛋白質）。HDAC4 類縁体としては、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変  
20 異体、糖鎖付加体等が包含される。また、HDAC4 類縁体として、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは 80%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。アミノ酸配列の相同性の程度は、例えば、NCBI(The National Center for Biotechnology  
25 Information) において、対象となるアミノ酸配列と対比すべきアミノ酸配列との間で BLAST をデフォルト設定にて用いることにより決定するこ

とができる。HDAC4に関する詳細については、例えば、国際公開第 WO 00/10583 号を参照のこと。

同様に、本発明では、HDAC8 として、好ましくは、ヒト由来の HDAC8 が用いられる。具体的には、HDAC8 とは、例えば、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、HDAC 酵素活性を有するものをいう（例えば、GenBank 登録番号 HSA277724 の塩基配列がコードする蛋白質）。HDAC8 類縁体として、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、HDAC8 類縁体として、配列番号 8 で示されるアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは 80%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。HDAC8 に関する詳細については、例えば、Joseph J. BUGGY et al., Biochemical Journal 350: 199-205 (2000)を参照のこと。

また、本発明では、N-CoR として、好ましくは、ヒト由来の N-CoR が用いられる。具体的には、N-CoR とは、例えば、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、HDAC4 や HDAC3 と複合体を形成できるものをいう（例えば、GenBank 登録番号 AF044209 の塩基配列がコードする蛋白質）。N-CoR 類縁体としては、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、N-CoR 類縁体として、配列番号 22 で示されるアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは 80%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。また、本発明では、N-CoR は、HDAC4（必要に応じて HDAC4 及び HDAC3 の両方）と複合体を形成できればよい。このような N-CoR とし

て、上記に挙げたものの他に、例えば、Matthew G. Guenther et al., Molecular and Cellular Biology, 21(18): 6091-6101 (2001)等の開示される N-CoR 変異体等も用いることができる。

また、本発明では、HDAC3 として、好ましくは、ヒト由来の HDAC3 が  
5 用いられる。具体的には、HDAC3 とは、例えば、配列番号 16 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質自体およびその類縁体であって、HDAC 酵素活性を有するもの、又は HDAC4 (必要に応じて HDAC4 - N-CoR 複合体) と結合しうるものをいう (例えば、GenBank 登録番号 U66914 の塩基配列がコードする蛋白質)。HDAC3 類縁体としては、配列番号 16 で示される  
10 アミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、HDAC3 類縁体として、配列番号 16 で示されるアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは 80%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。また、  
15 HDAC3 と N-CoR との複合体 (必要に応じて、HDAC3 と HDAC4 - N-CoR 複合体との高次複合体) の解析においては、HDAC3 は、HDAC4 (必要に応じて、HDAC4 - N-CoR 複合体) との結合能さえ維持していれば必ずしも HDAC 酵素活性を有しなくともよい。HDAC3 に関する詳細については、例えば、Molecular Cell, 9: 45-57 (January, 2002)、及び Matthew G. Guenther  
20 et al., Molecular and Cellular Biology, 21(18): 6091-6101 (2001) 等を参照のこと。

さらに、本発明では、HDAC1~2、HDAC5~7 として、好ましくは、ヒト由来のものが用いられる。具体的には、HDAC1~2、HDAC5~7 は、それぞれ、GenBank 登録番号 D50405 の塩基配列 (HDAC1)、GenBank 登録番号  
25 HSU31814 の塩基配列 (HDAC2)、GenBank 登録番号 AF132608 の塩基配列 (HDAC5)、GenBank 登録番号 AF132609 の塩基配列 (HDAC6)、GenBank 登

- 録番号 AF239243 の塩基配列 (HDAC7) がコードする蛋白質自体およびその類縁体であって、HDAC 酵素活性を有するものである。また、HDAC1~2、HDAC5~7 類縁体としては、それぞれ、上記 HDAC1~2、HDAC5~7 に対応するアミノ酸配列において 1 又は 2 個以上のアミノ酸が置換、欠失、付
- 5 加された変異体、糖鎖付加体等が包含される。また、HDAC1~2、HDAC5~7 類縁体として、それぞれ、上記 HDAC1~2、HDAC5~7 に対応するアミノ酸配列と、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなる蛋白質を用いることもできる。
- 10 さらに、本発明は、上述のようにして選択された血小板減少作用の少ない免疫抑制剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤について、GATA-1 産生阻害活性の程度をさらに確認することにより、血小板減少作用の少ないHDAC4 及び／又はHDAC8 選択的阻害剤を選択する方法に関する。GATA-1 産生阻害活性の程度は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の共存下及
- 15 び／又は非共存下、例えば、GATA-1 を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等の細胞において GATA-1 mRNA、GATA-1 蛋白質又は GATA-1 レポーター遺伝子の発現量を測定することによって評価することができるが、アッセイの簡便性、感度等の観点から、GATA-1 レポーター遺伝子の発現量を測定することが好ましい。
- 20 上記方法において、GATA-1 産生阻害活性を測定するために用いられる試験細胞としては、GATA-1 を天然で発現している細胞株や初代培養細胞等を用いることができる。特定の細胞株や初代培養細胞が GATA-1 を天然で発現しているか否かは、それら細胞における GATA-1 mRNA 又は蛋白質の発現を当該分野で公知の方法により確認することにより評価できる。
- 25 また、上記方法で用いられる試験細胞としては、巨核球系列の細胞の状態を実質的に反映した細胞も好ましい。巨核球系列の細胞の状態を実質

的に反映した細胞株としては、巨核球系列に由来する細胞であれば、特に限定されないが、例えば、ヒト由来の HEL 細胞（受託番号 JCRB0062, Japanese Collection of Research Bioresources）を用いることができる。

- 5 GATA-1 mRNA 若しくは GATA-1 蛋白質の発現量により HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤の GATA-1 産生阻害活性を評価する場合において、試験細胞を HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤と共存させる方法としては、細胞の培養液に HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤を添加して、培養すればよい。

- 10 GATA-1 レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイにより HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤の GATA-1 産生阻害活性を評価する場合において、試験細胞を HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤と共存させる方法としては、エレクトロポレーション等の遺伝子導入法により細胞に GATA-1 レポーター遺伝子を導入する前後に、細胞の培養液に HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤を添加すればよい。好ましくは、GATA-1 レポーター遺伝子を導入  
15 後、培養液に HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤を添加して、さらに培養すればよい。

- GATA-1 mRNA の発現量は、例えば、試験細胞から total RNA をそれぞれ調製し、競合的 RT-PCR やリアルタイム RT-PCR 等の当該分野で公知の定量的 RT-PCR 等によって GATA-1 mRNA の発現量を比較することにより確認することができる。  
20

- GATA-1 蛋白質の発現量は、例えば、HDAC4 及び／又は HDAC8 阻害剤の共存下及び非共存下におかれた細胞から抽出液を調製し、抗 GATA-1 抗体及び、標識された 2 次抗体を用いて測定することができる。その手法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA 法）、ELISA 法（E. Engvall et al., Methods in Enzymol., 70: 419-439 (1980)）、蛍光抗体法、ブランク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）  
25

等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社 R & D プランニング 発行、第 30 頁～第 53 頁、昭和 57 年 3 月 5 日）を利用することができ、  
5 当業者であれば、容易に実施可能である。上記手法は種々の観点から適宜選択することができるが、感度、簡便性等の点からは E L I S A 法が好ましい。上記 2 次抗体を標識するにあたり使用される標識物質としては、上述したものと同様のものを用いることができる。

また、GATA-1 レポーター遺伝子の発現量は、GATA-1 レポーター遺伝子を用いるレポーターアッセイにより評価することができる。「GATA-1 レ  
10 ポーター遺伝子」とは、GATA-1 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子とを人工的に連結させた DNA 構築物をいう。GATA-1 遺伝子の転写制御領域としては、ヒト GATA-1 遺伝子 (GenBank Accession Number: AF196971) の I E プロモーター領域及びその上流約 3.5 kb 付近に離れて存在する HSI 領域 (DNase I 高感受性領域) の両方を含む DNA 断片が用いられ  
15 る。本発明の目的に必要な転写制御領域の範囲としては、単に転写活性を保持しているのみならず、巨核球系細胞における天然の GATA-1 遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したものであることが望ましい。

GATA-1 遺伝子のプロモーターについては、I E プロモーター及び I T プロモーターの少なくとも 2 種類が存在することが知られている。この  
20 うち、HDAC 阻害剤による血小板減少作用との関連においては、巨核球系細胞における転写制御と密接に関連していることが判明している I E プロモーターの機能が重要と推定されているため、その制御領域を用いることが好ましい。

I E プロモーターによる転写制御には、転写開始点のすぐ上流約 0.7 kb 内に存在する配列とさらに上流に存在する HSI 領域 (DNase I 高  
25 感受性領域) の両方が重要である。HSI 領域の 5' 側には、2 個の CACC

site が存在し、それから約 50 塩基対離れて、GATA 結合部位 (GATA binding site) と E-box モチーフが約 10 塩基対離れて隣り合っている。このうちの GATA 結合部位を壊すような変異を導入すると、赤血球や巨核球特異的な発現が見られなくなることが知られている (P. Vyas et al., Development 126; 2799-2811 (1999))。また、この GATA-E-box モチーフのさらに 3' 側には、特徴的なパリンδροーム配列である CTGTGGCCACAG 配列 (配列番号 86) 及び、GC に富む領域が存在する。GC に富む領域の中には、転写因子の ETS の結合部位に見られる GGA A 配列が存在する。これらの配列を含む GATA-1 HSI 領域のうち、5' 側の CACC site を欠損させても、赤血球や巨核球特異的な発現が見られるが、GATA-E-box motif まで欠損させると、発現は消失する。3' 側については、最大でも E-box の下流約 250 塩基対までを含めば、エンハンサーとして機能することが報告されている。従って、以上のような必須の配列部位をすべて含んでいるならば、実際にはどのような長さの配列でもかまわないが、たとえば、ヒト GATA-1 遺伝子の IE プロモーターによる転写開始点近傍 (-789 から +30: 転写開始点を +1 とする) 819 塩基対を含む領域と転写開始点上流の HIS 領域として 637 塩基対 (-3769 から -3133) を含む領域を人工的に連結させたものを用いることができる。

GATA-E-box motif 等の必須な配列部位については、通常の組換え DNA 実験の手法により、それらの必須配列を複数個タンデムに重複させた人工的な DNA 構築物を作製することが可能である。このような人工的構築物を天然の配列と入れ換えて用いることにより、当該転写制御領域の転写誘導活性を増強させることができる場合がある。

なお、「レポーター遺伝子」とは、遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域と下流の非翻訳領域 (3'-non coding region) から構成され、構造遺伝子上流側に本来存在する転写制御領域を

すべて欠失したものをいう。遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域については、外来遺伝子断片と人工的に連結させて細胞に導入することにより、当該外来遺伝子断片に含まれる転写制御領域からの遺伝子発現をそのレポーター遺伝子がコードする目印となる蛋白質の機能から容易に測定可能なものであれば、どのようなものでもかまわない。より好ましくは、当該目印となる蛋白質は、通常の哺乳類細胞中で安定的に存在し、同様の活性を示す内在的な蛋白質が当該細胞中に存在しないか、仮に存在しても容易に区別して測定可能なものであることが望ましい。また、より好ましくは、当該目印となる蛋白質をコードする mRNA は、細胞内で安定的に存在するものであることが望ましい。また、当該目印となる蛋白質の基質は、活性を測定するに際して、新たに添加する必要がないものであるか、あるいは添加を必要とするも、細胞内に容易に十分量取り込まれ得るものであることが望ましい。また、これらによって構成される測定系は、広範囲の直線性と高感度性を兼ね備えたものであることが望ましい。ホタル(firefly)由来のルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ (Renilla) 由来のルシフェラーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、緑色蛍光蛋白質 (GFP, Green Fluorescent Protein) 遺伝子、増強型緑色蛍光蛋白質 (EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -Glucuronidase) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase, HRP) 遺伝子などを用いることが可能である。より好ましくは、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を用いればよい。ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子については、改良型のルシフェラーゼ遺伝子 (luc+) を用いることにより、測定系の検出感度を上げることができる。構造遺伝子下流の非翻訳領域については、



例えば SV40 ウイルスゲノム後期遺伝子由来の配列を用いることができる。

上述の GATA-1 レポーター遺伝子は、それぞれクローニングベクターに連結し、大腸菌を宿主として増幅させる。その際のクローニングベクターとしては、大腸菌で増幅可能な複製開始点と選択マーカーをもったものであれば、特に限定されないが、例えばアンピシリン耐性マーカーと改良型のルシフェラーゼ構造遺伝子 (luc+) をコードした pGL3-Basic (Promega Corporation) などを用いれば、上述の DNA 構築物を容易に作製できる。その後、増幅したベクターを細胞に一過的に導入して、レポーター活性を測定すればよい。

また、本発明は、上述した方法を実施するために上記した必要なものの全て又は一部を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、あるいは GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤等を選択するためのキットに関する。HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キットとしては、例えば、(i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6、HDAC7 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液、(ii) HDAC4 及び／又は HDAC8 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液を含むものが挙げられる。さらに、上記キットは、他の構成物や使用説明書等を含んで構成することができる。

本発明は、上述した方法によって、又は上述したキットを用いることによって得られた血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、あるいは GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤等の化合物を包含する。

さらに、上述した方法によって、又は上述したキットを用いることによって得られた化合物は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、GATA-1

產生阻害活性の少ない IL-2 產生阻害剤、および血小板減少作用の少ない HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤として、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球形白血病、原虫感染症、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚、角膜、肺、脾臓、小腸、手足、筋肉、神経、椎間板、気管、筋芽細胞、軟骨等の臓器または組織の移植の際の拒絶反応、骨髄移植による移植片対宿主反応、自己免疫疾患、癌等の疾患の治療や予防に有用である。本発明は、このような化合物を有効成分として含む上記疾患の治療用及び／又は予防用医薬、並びにこのような化合物の有効量を投与することを特徴とする上記疾患の治療及び／又は予防方法に関する。

上述した方法によって、又は上述したキットを用いることによって得られた化合物を医薬として用いる場合には、それ自体として医薬として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体若しくは媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤等、製剤に用いられる公知のものと適宜組み合わせた医薬製剤の形態、例えば固体、半固体または液体（例えば錠剤、丸剤、トローチ剤、カプセル剤、坐薬、クリーム剤、軟膏剤、エアロゾル剤、散剤、液剤、乳剤、懸濁剤など）で用いることができる。

患者への投与は、鼻、眼、外部（局所）、直腸、肺（鼻または口内注入）、経口または非経口（皮下、静脈および筋肉内を含む）投与または吸入に適している。注射剤の投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の公知の方法により行なうことができる。投与量は、患者の体重、年齢及び病状、並びに、用いる投与方法等により変わるものであるが、当業者であれば、適切な投与量を適宜選択することが可能である。

また、本発明は、正常な HDAC4 酵素の機能を欠損する変異体（即ち、HDAC4 ドミナントネガティブ (dominant netgative) 変異体）に関する。HDAC4 ドミナントネガティブ変異体としては、例えば、配列番号 4 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する（からなる）HDAC4 変異体が  
5 挙げられる。さらに、本発明は、配列番号 4 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常な HDAC4 酵素の機能を欠損する変異体をも包含する。

さらに、本発明は、上述した HDAC4 ドミナントネガティブ変異体をコードする塩基配列を有する（からなる）DNA に関する。より具体的には、本発明は、配列番号 3 又は配列番号 5 に記載の塩基配列を有する（からなる）DNA に関する。また、本発明は、配列番号 4 又は配列番号 6  
10 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常な HDAC4 酵素の機能を欠損する変異体をコードする塩基配列を有する DNA をも包含する。

また、本発明は、正常な HDAC1 酵素の機能を欠損する変異体（即ち、HDAC1 ドミナントネガティブ変異体）に関する。HDAC1 ドミナントネガティブ変異体としては、例えば、配列番号 1 2 又は配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列を有する（からなる）HDAC1 変異体が挙げられる。さらに、本発明は、配列番号 1 2 又は配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列におい  
15 て、1 以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常な HDAC1 酵素の機能を欠損する変異体をも包含する。

さらに、本発明は、上述した HDAC1 ドミナントネガティブ変異体をコードする塩基配列を有する（からなる）DNA に関する。より具体的には、本発明は、配列番号 1 1 又は配列番号 1 3 に記載の塩基配列を有する（からなる）DNA に関する。また、本発明は、配列番号 1 2 又は配  
20 列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸の欠失、

置換、付加を有し、かつ正常な HDAC1 酵素の機能を欠損する変異体をコードする塩基配列を有する DNA をも包含する。

また、本発明は、正常な HDAC3 酵素の機能を欠損する変異体（即ち、HDAC3 ドミナントネガティブ変異体）に関する。HDAC3 ドミナントネガティブ変異体としては、例えば、配列番号 18 又は配列番号 20 に記載のアミノ酸配列を有する（からなる）HDAC3 変異体が挙げられる。さらに、本発明は、配列番号 18 又は配列番号 20 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸の欠失、置換、付加を有し、かつ正常な HDAC3 酵素の機能を欠損する変異体をも包含する。

10 さらに、本発明は、上述した HDAC3 ドミナントネガティブ変異体をコードする塩基配列を有する（からなる）DNA に関する。より具体的には、本発明は、配列番号 17 又は配列番号 19 に記載の塩基配列を有する（からなる）DNA に関する。また、本発明は、配列番号 18 又は配列番号 20 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸の欠失、  
15 置換、付加を有し、かつ正常な HDAC3 酵素の機能を欠損する変異体をコードする塩基配列を有する DNA をも包含する。

HDAC1、HDAC3、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体やこれらの変異体を含む酵素液、及びこれらの変異体をコードする DNA は、例えば、上述したスクリーニングにおいてネガティブコントロールとして使用することが  
20 できる。また、本発明のスクリーニング方法を行なうためのキットにおいて、これらの HDAC1、HDAC3、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体、これらの変異体を含む酵素液、又はこれらの変異体をコードする DNA を含めることもできる。

以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例等に何ら制約されるものではない。

実施例 1 : IL-2 レポーター遺伝子アッセイ用のレポーター遺伝子プラスミドの構築

- 5 ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の-674 ~ +54 の領域に相当する 728 塩基対断片を、ヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞 (ATCC, TIB-152) より単離した Genomic DNA を鋳型 (template) にして、PCR 法により取得した。PCR には、下記の配列番号 27 及び配列番号 28 で示したプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベース GenBank の Locus
- 10 code: HSIL05 に記載されたヒト IL-2 遺伝子配列を基に設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた 728 塩基対断片は、プロモーター上流側に Nhe I 認識部位、プロモーター下流側に Hind III 認識部位を有している。増幅した 728 塩基対断片をクローニングベクター pCR4
- 15 (Invitorgen 社製) に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列 (配列番号 23) を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列 (配列番号 23) では、GenBank の Locus code: HSIL05 に記載された IL-2 のプロモーター配列 (配列番号 29) と比較して、図 1 に示したように 3ヶ所の塩基置換、1ヶ所の 2 塩基挿入及び 1ヶ所の 1 塩
- 20 基挿入が確認された。次に、得られたプラスミドを Nhe I 認識部位及び Hind III 認識部位で切断した。得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーター遺伝子アッセイ用ベクター pGL3 basic (Promega 社製) の Nhe I/Hind III 部位に挿入した。これにより、ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の-675 ~ +56 の領域に相当する 731 塩基対の配列
- 25 (配列番号 23) をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するプラスミド pGL3 IL2 Pro を得た。

TCGCTAGCCTGAGTATTTAACAATCGCACCCCT (配列番号 27)

CGAAGCTTGTGGCAGGAGTTGAGGTTACTG (配列番号 28)

次に、pGL3 IL2 Pro を鋳型にして、ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の -379 ~ +56 の領域に相当する 435 塩基対断片を、PCR 法により取得した。PCR には、下記の配列番号 30 及び上記の配列番号 28 で示したプライマーを用いた。配列番号 30 のプライマーは pGL3 IL2 Pro に挿入されているヒト IL-2 遺伝子配列を基に設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた 435 塩基対断片は、プロモーター上流側に

10 Nhe I 認識部位、プロモーター下流側に Hind III 認識部位を有している。増幅した 435 塩基対断片をクローニングベクター pCR4 に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列 (配列番号 24) を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列 (配列番号 24) では、GenBank の Locus code: HSIL05 に記載された IL-2 のプロモーター配列 (配列番号 31) と比較して、図 2 示したように 2ヶ所の塩基置換と 1ヶ所の 2塩基の挿入が確認された。次に、得られたプラスミドを Nhe I 認識部位及び Hind III 認識部位で切断した。得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーター遺伝子アッセイ用ベクター pGL3 basic の Nhe I/Hind III 部位に挿入した。これにより、ヒト IL-2 遺伝子の転写

20 開始点近傍の -379 ~ +56 の領域に相当する 435 塩基対のプロモーター配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するプラスミド pGL3 IL2 Pro43 を得た。

CGCTAGCTGCTCTTGTCCACCACAATATGC (配列番号 30)

25 実施例 2 : GATA-1 レポーター遺伝子アッセイ用のレポーター遺伝子プラスミドの構築

- ヒト GATA-1 遺伝子転写開始点近傍の-789 ~ +32 の領域に相当する 821 塩基対断片を、ヒト Genomic DNA を鋳型にして、PCR 法により取得した。PCR には、下記の配列番号 3 2 及び配列番号 3 3 で示されるプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベース GenBank の
- 5 Accession 番号 AF196971 に記載されたヒト GATA-1 遺伝子配列を基に設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた 821 塩基対断片は、プロモーター上流側に Bgl II 認識部位、プロモーター下流側に Hind III 認識部位を有している。増幅した 821 塩基対断片をクローニング
- 10 グベクター pCR4 に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列（配列番号 2 5）を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列（配列番号 2 5）は、GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載された GATA-1 のプロモーター配列と一致していた（図 3）。次に、得られたプラスミドを Nhe I 認識部位及び Hind III 認識部位で切断した。得
- 15 られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むレポーター遺伝子アッセイ用ベクター pGL3 basic の Nhe I/Hind III 部位に挿入した。これにより、GATA-1 遺伝子のプロモーター領域-789 ~ +32 の領域に相当する 821 塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するプラスミド pGL3-IE を得た。
- 20 ATAGATCTATCCCTGGCTCCACCTCAG（配列番号 3 2）  
ATAAGCTTTGGTGGTTGCGGAGGGTTTCG（配列番号 3 3）

- 次に、ヒト GATA-1 遺伝子転写開始点上流-3769 ~ -3133 の領域に相当する 637 塩基対断片を、ヒト Genomic DNA を鋳型にして、PCR 法により取得した。PCR には、下記の配列番号 3 4 及び配列番号 3 5 で示した
- 25 プライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベース GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載されたヒト GATA-1 遺伝子配列を基に

- 設計した。また、レポーター遺伝子アッセイ用ベクターに挿入するため、プライマーの末端に制限酵素認識部位を付加した。得られた 637 塩基対断片は、プロモーター上流側に Kpn I 認識部位、プロモーター下流側に Nhe I 認識部位を有している。増幅した 637 塩基対断片をクローニングベクター pCR4 に挿入した。次いで、得られたプラスミドにおける挿入領域の塩基配列（配列番号 26）を確認した。その結果、挿入領域の塩基配列（配列番号 26）は、GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載された GATA-1 のプロモーター配列と一致していた（図 4）。さらに、得られたプラスミドを Kpn I 認識部位及び Nhe I 認識部位で切断した。得られた断片を、pGL3-IE プロモーターの Kpn I/Nhe I 部位に挿入した。これにより、GATA-1 遺伝子の転写開始点上流-3769 ~ -3133 の領域に相当する 637 塩基対、及び-789 ~ +32 の領域に相当する 821 塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド pGL3-HSI-IE Pro を得た。
- 15 ATGGTACCACCCCAGAAGATGCCAGGAG（配列番号 34）  
ATGCTAGCGCCCTCTGAGCCTCAGTTTC（配列番号 35）

### 実施例 3：

#### 3. 1. HDAC1~8 サブクローニング用プラスミドの構築

- 20 表 1 に示される鋳型とプライマーを用いて PCR により各種 HDAC アイソザイム全長を増幅し、一旦 pGEM-T (Promega) にサブクローニングした。その後、HDAC1~6 全長を制限酵素（HDAC1: EcoRI/NotI, HDAC2: BamHI/NotI, HDAC3: EcoRI/NotI, HDAC4: EcoRI/NotI, HDAC5: HindIII/NotI, HDAC6: HindIII/NotI）処理によって pBluescriptII KS(+) 25 (TOYOBO) へ挿入した。HDAC7, 8 全長は pUC18 (TaKaRa) (SmaI 処理) にサブクローニングした。詳細については、表 1 を参照のこと。



表1 HDAC1～8 サブクローニング用プラスミドの作製

HDAC アイソライム	HDAC 全長増幅用の鋳型	HDAC 全長増幅用のプライマー対の配列	GenBank登録番号 <sup>注1)</sup>	PCR産物のサイズ <sup>注2)</sup>	作製したプラスミドの名称 <sup>注3)</sup>
HDAC1	Jurkat T-cell cDNA library (Clontech)	HDAC1-E: GAGGAATTCAAGATGGCGCAGAC (配列番号36) HDAC1-N: GGAGCGCGCGCTTCAGCCCACTTG (配列番号37)	D50405	約 1.5kbp	pMH107
HDAC2	Human brain cDNA library (Clontech)	HDAC2-B: GGGGATCCATGGGTACAGTCAAG (配列番号38) HDAC2-N: GGTGGCGCGCCCAATTTCAGGGCTTGCTG (配列番号39)	HSU31814	約 1.5kbp	pMH111
HDAC3	Human placenta cDNA library (Clontech)	HDAC3-E: CCGGATCCACCATGGCCCAAGAC (配列番号40) HDAC3-N: GCAGCGCGCGCCACTCTTAAATCTCCAC (配列番号41)	U66914	約 1.2kbp	pMH108
HDAC4	Human brain cDNA library (Clontech)	HDAC4-E: GGGAAATTCATGAGCTCCCAAGCCATCC (配列番号42) HDAC4-N: AAGGCGCGCGAGCTTCGAGGAGTGTCTAC (配列番号43)	AF132607	約 3.2kbp	pMH106
HDAC5	Human brain cDNA library (Stratagene)	HDAC5-H: GGCAGCTTATGAACTCTCCCAACGAG (配列番号44) HDAC5-N: GGCAGCGCGCGCTCAGAGGCGAGCTCTCTG (配列番号45)	AF132608	約 3.3kbp	pMH109
HDAC6	Human brain cDNA library (Stratagene)	HDAC6-H: GCGAAGCTTATGAACTCTCCCAACGAG (配列番号46) HDAC6-N: GCATGGCGCGCGCTTACTGTGGTGGGCATATC (配列番号47)	AF132609	約 3.6kbp	pMH110
HDAC7	Human kidney cDNA library (Clontech)	HDAC7/forward: CGAATTCAGCGCGAGCCCATGGACCT (配列番号48) HDAC7/reverse: CCGTACCCCTGTGCACCCCGGATCAGG (配列番号49)	AF239243	約 2.6kbp	pUC18-HDAC7
HDAC8	Human lung cDNA library (Clontech)	HDAC8/forward: CGAATTCCTTAAAGGGAAGATGAGG (配列番号50) HDAC8/reverse: AGGTACCGACACATGCTTCAGATTC (配列番号51)	HSA277724	約 1.1kbp	pUC18-HDAC8

注1) プライマー設計時に参考にした各種 HDAC の GenBank 登録番号

注2) 各種 HDAC 全長のサイズ

注3) 各 HDAC について作製されたプラスミドの名称。サブクローニング用プラスミドは、HDAC1～6については pBluescriptII KS (+) を、HDAC7 及び 8 については pUC18 を用いた。

### 3. 2. HDAC1~8 発現用プラスミドの構築

次に、HDAC1~8 の C 末端に Flag 配列を付加した発現用プラスミドを作製した。詳細は、以下の通りである。

#### HDAC3

- 5     pMH108 を鋳型として、下記のプライマー108E (配列番号 5 2) 及び 108KFN (配列番号 5 3) を用いて PCR により HDAC3 全長を増幅した。尚、プライマーは、C 末端に Flag 配列 (DYKDDDDK) (配列番号 5 4) を付加するように設計した。得られた PCR 断片を pGEM-T (Promega) にサブクローニングし、pGEM-HDAC3-Flag (E108KFN) を得た。E108KFN を
- 10   EcoRI/NotI (約 1.2kbp 断片) 処理によって pEAK10 (Edge BioSystems) に挿入し、pEAK-HDAC3 (pMH118) を得た。

108E: CTGAATTCACCATGGCCAAGACCG (配列番号 5 2)

108KFN: GGGCGGCCGCCTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAATCGGTACCAATCTCCACATCGCTTTC (配列番号 5 3)

#### 15   HDAC1

- pMH107 を鋳型として、プライマーHDAC1-E (配列番号 3 6) 及び 107K (配列番号 5 5) を用いて PCR により HDAC1 全長を増幅した。尚、プライマーは、C 末端の停止コドンを変更し、KpnI 部位を挿入するように設計した。得られた PCR 断片を pGEM-T (Promega) にサブクローニングし、
- 20   pGEM-HDAC1 (E107K) を得た。E107K を EcoRI/KpnI (約 1.5kbp 断片) 処理によって pMH118 (EcoRI/KpnI) 約 6kbp に挿入し、pEAK-HDAC1 (pMH119) を得た。

107K: ATCGGTACCGGCCAACTTGACCTCCTCCTTG (配列番号 5 5)

#### HDAC2

- 25   pMH111 を鋳型として、プライマーHDAC2-B (配列番号 3 8) 及び 111K (配列番号 5 6) を用いて PCR により HDAC2 全長を増幅した。尚、プラ

イマーは、C末端の停止コドンを変更し、KpnI 部位を挿入するように設計した。得られた PCR 断片を pGEM-T (Promega) にサブクローニングし、pGEM-HDAC2 を得た。pGEM-HDAC2 を BamHI/KpnI 処理によって

pFLAG-CMV-5a (SIGMA) (BamHI/KpnI) に挿入し、pFLAG-CMV-5a-HDAC2

5 (pMH113) を得た。pMH113 を EcoRI/KpnI (約 1.5kbp 断片) 処理によって

pMH118 (EcoRI/KpnI) 約 6kbp に挿入し、pEAK-HDAC2 (pMH121) を得た。

111K: ATCGGTACCGGGGTTGCTGAGCTGTTCTG (配列番号 5 6)

#### HDAC4

pMH106 を鋳型として、プライマーHDAC4-E (配列番号 4 2) 及び 106B

10 (配列番号 5 7) を用いて PCR により HDAC4 全長を増幅した。尚、プライ

イマーは、C末端の停止コドンを変更し、Bgl II 部位を挿入するように設計した。得られた PCR 断片を pGEM-T (Promega) にサブクローニングし、pGEM-HDAC4 (E106B) を得た。また、pBluescriptII KS(+) の

EcoRI/NotI 処理断片約 3kbp に BglII site および FLAG 配列 (DYKDDDDK)

15 を有するリンカーオリゴ (FLAG-E (配列番号 5 8)、FLAG-N (配列番号 5

9) をアニーリングさせたもの) を挿入し、pBlue-Flag を得た。E106B

を EcoRI/BglIII 処理により pBlue-Flag に挿入し、pBKS-HDAC4 (E106BN)

を得た。E106BN を EcoRI/NotI (約 3.2kbp 断片) 処理によって pEAK10

(Edge Byo Systems) (EcoRI/NotI) 約 6kbp に挿入し、pEAK-HDAC4

20 (pMH122) を得た。

106B: GATAGATCTCAGGGGCGGCTCCTCTTC (配列番号 5 7)

FLAG-E: AATTCCTGCAGAGATCTGATTACAAGGACGACGATGACAAGTAGGC (配列番号 5 8)

FLAG-N: GGCCGCCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCAGATCTCTGCAGG (配列番号 5 9)

25

#### HDAC5

p3XFLAG-CMV-10 (SIGMA) (HindIII/NotI) 約 6.3kbp に pMH109  
HindIII/NotI 断片約 3.3kbp を挿入し、p3XFLAG-CMV-10-HDAC5 (pMH144)  
を得た。

#### HDAC6

- 5      p3XFLAG-CMV-10 (SIGMA) (HindIII/NotI) 約 6.3kbp に pMH110  
HindIII/NotI 断片約 3.6kbp を挿入し、p3XFLAG-CMV-10-HDAC6 (pMH145)  
を得た。

#### HDAC7

- PMH118 (EcoRI/KpnI) 約 6kbp に pUC18-HDAC7 EcoRI/KpnI 断片約 2.6kbp  
10      を挿入し、pEAK-HDAC7 (pMH141) を得た。

#### HDAC8

PMH118 (EcoRI/KpnI) 約 6kbp に pUC18-HDAC8 EcoRI/KpnI 断片約 1.1kbp  
を挿入し、pEAK-HDAC8 (pMH140) を得た。

作製した各 HDAC 発現用ベクターの詳細については、表 2 を参照のこと。

表 2 HDAC1～8 発現用プラスミドの作製

HDAC	用いられた発現用プラスミド <sup>注1)</sup>	各 HDAC に対する Flag タグ (DYKDDDK) の位置	作製したプラスミドの名称
HDAC1	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH119
HDAC2	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH121
HDAC3	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH118
HDAC4	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH122
HDAC5	p3XFLAG-CMV-10 (SIGMA)	N 末端	pMH144
HDAC6	p3XFLAG-CMV-10 (SIGMA)	N 末端	pMH145
HDAC7	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH141
HDAC8	pEAK10 (Edge Bio Systems)	C 末端	pMH140

注 1) pEAK10 (Edge Bio Systems)は、EF1 $\alpha$  (伸長因子 1 $\alpha$ ) プロモーターにより制御される。  
p3XFLAG-CMV-10 (SIGMA)は、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーターにより制御される。

また、HDAC1, 2, 3, 4, 7, 8 は、EcoRI/NotI にて、HDAC5, 6 は、HindIII/NotI にて  
各発現用プラスミドに挿入されている。

実施例 4: IL-2 転写活性に対する HDAC 各種アイソザイム過剰発現の効果

ヒト IL-2 プロモーター配列 (転写開始点近傍の -674 ~ +54 の領域) をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド pGL3 IL2 Pro43 1  $\mu$ g と pRL-TK (Promega) 6  $\mu$ g および各種 HDAC アイソザイム発現用または mock プラスミド (mock プラスミドは pBAK10 であり、各種 HDAC 発現用プラスミドは、それぞれ、HDAC1: pMH119, HDAC2: pMH121, HDAC3: pMH118, HDAC4: pMH122, HDAC5: pMH144, HDAC6: pMH145, HDAC7: pMH141, HDAC8: pMH140 である) 10  $\mu$ g を混和し、エレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 300V、電荷 975  $\mu$ F、400  $\mu$ L) により、  
10  $1 \times 10^7$  cells の Jurkat 細胞 (ATCC, TIB-152) を形質転換した。

形質転換後、2.5 mL の 10 % FBS (MOREGATE) を含む RPMI 1640 (SIGMA) (10 % FBS RPMI 1640) を加え、50  $\mu$ L/well の割合で、96well white plate に分注した。37°C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 10 時間培養後、10 % FBS RPMI 1640 液を 50  $\mu$ L/well ずつ添加し、さらに Phorbol 12-Myristate  
15 13-Acetate (PMA, SIGMA)、Ionomycin (SIGMA)、Anti CD28 antibody (Pharmingen) を 10 % FBS RPMI 1640 で混合した液を 50  $\mu$ L/well ずつ加え (終濃度それぞれ 50 ng/mL、1  $\mu$ g/mL、75 ng/mL)、Jurkat 細胞を刺激した。37°C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 12 時間培養後、Dual Luciferase Assay System (Promega) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ  
20 活性を、マルチラベルカウンター (1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC) により測定した。

その結果、PMA、Ionomycin、Anti CD28 antibody による Jurkat 細胞への刺激に応答して、pGL3 IL2 Pro43 からルシフェラーゼが誘導され、その発現量が HDAC4, 8 の過剰発現により増加することがわかった (図 5)。  
25 また、各種 HDAC アイソザイムの過剰発現が、細胞増殖度に大きな影響を

及ぼさないことを Cell Counting Kit-8 (DOJIN) を用いて確認した (図 5)。

以上の結果から、HDAC4, 8 が IL-2 転写系に関与する HDAC アイソザイムであることがわかった。

5

#### 実施例 5 : GATA-1 転写活性に対する HDAC 各種アイソザイム過剰発現の効果

ヒト GATA-1 プロモーター配列 (転写開始点近傍の -3769 ~ -3133 および -789 ~ +32 の領域) をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド pGL3-HSI-IE Pro 5  $\mu$ g および各種 HDAC アイソザイム発現用または mock プラスミド (mock は pEAK10、HDAC1~4, 7, 8 は EF-1  $\alpha$  プロモーター支配下、HDAC5, 6 は CMV プロモーター支配下、各種 HDAC アイソザイムは C 末端または N 末端に Flag タグを有する) 10  $\mu$ g を混和し、エレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 1750V、電荷 10  $\mu$ F、365  $\mu$ L) により、 $8.75 \times 10^5$  cells の HEL 細胞 (受託番号 JCRB0062、JCRB) を形質転換した。形質転換後、2 mL の 10 % FBS RPMI 1640 を加え、50  $\mu$ L/well の割合で、96well white plate に分注した。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 3 時間培養後、10 % FBS RPMI 1640 培地を 100  $\mu$ L/well ずつ加えた。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 8 時間培養後、Dual Luciferase Assay System のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより測定した。

20

その結果、pGL3-HSI-IE Pro から GATA-1 のプロモーターに依存したルシフェラーゼが誘導され、更に、誘導されるルシフェラーゼの発現量は、HDAC1, 3, 7 の過剰発現により若干上昇することがわかった (図 6)。

以上より、GATA-1 転写系には HDAC1, 3, 7 が関与しており、IL-2 転写系に関与する HDAC4, 8 は GATA-1 転写系には大きく関与しないことがわかった。

5 実施例 6 : HDAC4 ドミナントネガティブ変異体の作製

- IL-2 転写への関与が大きいと思われる HDAC4 について、内在性 HDAC4 の機能を失わせる目的で HDAC4 ドミナントネガティブ (dominant negative) 変異体を作製することとした。そこで、PNAS, 1998, Vol. 95, p. 3519-3524. & Mol. Cell. Biol., 1999, Vol. 19 (11), p. 7816-7827 の
- 10 文献情報より HDAC 活性を低下させるための変異導入部位を決定した (H802K H803L、H863L) (図 7)。ヒト HDAC4 CDS 塩基配列を GenBank の accession 番号 AF132607 より入手し、変異導入のためのプライマーを設計した (各プライマーの塩基配列については表 3 を参照、HDAC4 CDS 塩基配列については配列番号 1、HDAC4 CDS 塩基配列がコードするアミノ
- 15 酸配列については配列番号 2 を参照)。



表 3 HDAC4 ドミナントネガティブ変異体の作製 (PCR 反応時の鋳型およびプライマー)

HDAC4 ドミナント ネガティブ変異体	鋳型	プライマー対の配列	PCR 産物 のサイズ
(H802K, H803L)	(1) E106EN	(1) NdeIFW: CAGTGACACCATATGGAACGAGG (配列番号 6 0) HDAC4-mutation-2RV: GCAAGCTTTCAGGGGGCG (配列番号 6 1)	(1) 約 140bp
	(2) E106BN	(2) HDAC4-mutation-2FW: CCCCCTGGAAAGCTTGGCGA (配列番号 6 2) BsrGIRV: GACATGTACAGGACGCTAGGGT (配列番号 6 3)	(2) 約 180bp
	(3) (1)、(2) の PCR 断片	(3) NdeIFW: CAGTGACACCATATGGAACGAGG (配列番号 6 0) BsrGIRV: GACATGTACAGGACGCTAGGGT (配列番号 6 3)	(3) 約 300bp
(H863L)	E106EN	mutation3FW: CCTGTACATGTCCCTCCTTCG (配列番号 6 4) 3' XbaBglRV: ATAGATCTAGACAGGGGGCGG (配列番号 6 5)	約 700bp

Expand(High fidelity PCR System (Roche))のプロトコールに従って PCR 反応を行った。鋳型に用いた E106BN は pBluescriptII KS(+) (TOYOBO) に HDAC4 CDS 全長が挿入(EcoRI/NotI, EcoRI 側が開始コドン)されたプラスミドである。

- 5     Topo TA cloning kit for sequence (Invitrogen 社) を用い、得られた PCR 産物 (H802K, H803L 変異体に関しては (3)) をそれぞれ TOP0 cloning vector for sequence にサブクローニングした (pCR4-HDAC4 (H802K, H803L) および pCR4-HDAC4 (H863L))。次いで、シーケンシングにより変異導入を確認した PCR 断片を、以下の手順で HDAC4 発現用プラスミド (pMH122) に挿入した。

HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K, H803L)

- E106BN (NdeI/BsrGI) 約 3kbp に pCR4-HDAC4 (H802K, H803L) NdeI/BsrGI 処理断片約 300bp を挿入し、pBKS-HDAC4 (H802K, H803L) を得た。続いて、pMH122 (EcoRI/NotI) 約 6kbp に pBKS-HDAC4 (H802K, H803L) EcoRI/NotI 処理断片約 3.3kbp を挿入し、pEAK-HDAC4 (H802K, H803L) を得た。HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K, H803L) のコード領域における塩基配列を配列番号 3 として、そのアミノ酸配列を配列番号 4 として示す。

HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L)

- 20     E106BN (BsrGI/BglII) 約 3kbp に pCR4-HDAC4 (H863L) BsrGI/BglII 処理断片約 750bp を挿入し、pBKS-HDAC4 (H863L) を得た。続いて、pMH122 (EcoRI/NotI) 約 6kbp に pBKS-HDAC4 (H863L) EcoRI/NotI 処理断片約 3.3kbp を挿入し、pEAK-HDAC4 (H863L) を得た。HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) のコード領域における塩基配列を配列番号 5 として、  
25     そのアミノ酸配列を配列番号 6 として示す。

実施例 7 : HDAC1 ドミナントネガティブ変異体の作製

HDAC4 ドミナントネガティブ変異体の作製と同様に、HDAC1 ドミナント  
ネガティブ変異体を作製した。ヒト HDAC1 CDS 塩基配列を GenBank の  
accession 番号 D50405 より入手し、変異導入のためのプライマーを設計  
5 した（各プライマーの塩基配列については表 4 を参照、HDAC1 CDS 塩基  
配列については配列番号 9、HDAC1 CDS 塩基配列がコードするアミノ酸  
配列については配列番号 10 を参照）。

表4 HDAC1 ドミナントネガティブ変異体の作製 (PCR 反応時の鋳型およびプライマー)

HDAC1 ドミナント ネガティブ変異体	鋳型	プライマー対の配列	PCR産物 のサイズ
(H140K, H141L)	(1) pEAK-HDAC1	(1) HDAC1-E: GAGGAATTCAAGATGGCGCAGAC (配列番号66) 1-140KL-RV: CTCGGACTTCTTTGCAAGCTTCAGG (配列番号67)	(1) 約 440bp
	(2) pEAK-HDAC1	(2) 1-140KL-FW: GGGCCTCAAGCTTGCAAGAAATC (配列番号68) 1-BsrGI-RV: GTGAATATCAATGTCTCAATGTACAGC (配列番号69)	(2) 約 120bp
	(3) (1)、(2)のPCR断片	(3) HDAC1-E: GAGGAATTCAAGATGGCGCAGAC (配列番号66) 1-BsrGI-RV: GTGAATATCAATGTCTCAATGTACAGC (配列番号69)	(3) 約 530bp
(H199L)	(1) pEAK-HDAC1	(1) 1-StuI-FW: GACGGGTGGAAGAGGCCCTTC (配列番号70) 1-199L-RV: GAAGTACTCTCCATCTTAAGAAAGG (配列番号71)	(1) 約 80bp
	(2) pEAK-HDAC1	(2) 1-199L-FW: CTGTGTCCTTCTTAAGTATGGAGAG (配列番号72) 1-HpaI-RV: TCTCGGAGCGGGTAGTTAACAG (配列番号73)	(2) 約 100bp
	(3) (1)、(2)のPCR断片	(3) 1-StuI-FW: GACGGGTGGAAGAGGCCCTTC (配列番号70) 1-HpaI-RV: TCTCGGAGCGGGTAGTTAACAG (配列番号73)	(3) 約 150bp

Expand(High fidelity PCR System (Roche))のプロトコールに従って PCR 反応を行った。鋳型に用いた pEAK-HDAC1 (pMH119)は pEAK10 に HDAC1 CDS 全長が挿入されたプラスミドである。

Topo TA cloning kit for sequence (Invitrogen 社) を用い、得られ  
5 た PCR product (3) をそれぞれ TOP0 cloning vector for sequence に  
サブクローニングした (pCR4-HDAC1 (H140K, H141L) および pCR4-HDAC1  
(H199L))。シーケンシングにより変異導入を確認した PCR 断片を、以下  
の手順で HDAC1 発現用プラスミド (pMH119) に挿入した。E107K は pGEM-T  
(Promega) に HDAC1 CDS 全長が挿入 (EcoRI/KpnI, EcoRI 側が開始コドン)  
10 されたプラスミドである。

#### HDAC1 ドミナントネガティブ変異体 (H140K, H141L)

E107K (EcoRI/BsrGI) (約 3kbp) に pCR4-HDAC1 (H140K, H141L) の  
EcoRI/BsrGI 処理断片 (約 530bp) を挿入し、pGEM-HDAC1 (H140K, H141L)  
を得た。続いて、pGEM-HDAC1 (H140K, H141L) (EcoRI/KpnI) 約 1.5kbp を  
15 pMH119 の EcoRI/KpnI 処理断片 (約 5.9kbp) に挿入し、pEAK-HDAC1  
(H140K, H141L) を得た。HDAC1 ドミナントネガティブ変異体  
(H140K, H141L) のコード領域における塩基配列を配列番号 1 1 として、そ  
のアミノ酸配列を配列番号 1 2 として示す。

#### HDAC1 ドミナントネガティブ変異体 (H199L)

20 E107K (StuI/HpaI) (約 3kbp) に pCR4-HDAC1 (H199L) の StuI/HpaI 処  
理断片 (約 150bp) を挿入し、pGEM-HDAC1 (H199L) を得た。続いて、  
pGEM-HDAC1 (H199L) (EcoRI/KpnI) 約 1.5kbp を pMH119 の EcoRI/KpnI  
処理断片 (約 5.9kbp) に挿入し、pEAK-HDAC1 (H199L) を得た。HDAC1 ドミ  
ナントネガティブ変異体 (H199L) のコード領域における塩基配列を配列  
25 番号 1 3 として、そのアミノ酸配列を配列番号 1 4 として示す。

実施例 8 : HDAC3 ドミナントネガティブ変異体の作製

- HDAC4 ドミナントネガティブ変異体の作製と同様に、HDAC3 ドミナントネガティブ変異体を作製した。ヒト HDAC3 CDS 塩基配列を GenBank の accession 番号 U66914 より入手し、変異導入のためのプライマーを設計
- 5 した（各プライマーの塩基配列については表 5 を参照、HDAC3 CDS 塩基配列については配列番号 1 5、HDAC3 CDS 塩基配列がコードするアミノ酸配列については配列番号 1 6 を参照）。

表5 HDAC3 ドミナントネガティブ変異体の作製 (PCR 反応時の鋳型およびプライマー)

HDAC3 ドミナント ネガティブ変異体	鋳型	プライマー対の配列	PCR産物 のサイズ
(H134K, H135L)	(1) pEAK-HDAC3	(1) 3-BglII-FW: AACCCAGCTGAACAACAAGATCTG (配列番号 74) 3-134KL-RV: CTCAAAACCTTCTTGGCAAGCTTCAGAC (配列番号 75)	(1) 約 75bp
	(2) pEAK-HDAC3	(2) 3-134KL-FW: TGGTGGTCTGAAGCTTGCCAGAAG (配列番号 76) 3-NcoI-RV: CCCGTCACCATGGTGGATGTC (配列番号 77)	(2) 約 140bp
	(3) (1)、(2)のPCR断片	(3) 3-BglII-FW: AACCCAGCTGAACAACAAGATCTG (配列番号 74) 3-NcoI-RV: CCCGTCACCATGGTGGATGTC (配列番号 77)	(3) 約 180bp
(H193L)	(1) pEAK-HDAC3	(1) 3-NcoI-FW: TGACATTGACATCCACCATGGTG (配列番号 78) 3-193L-RV: GAAGTAATTTCCGTACTTAAGGAAGG (配列番号 79)	(1) 約 100bp
	(2) pEAK-HDAC3	(2) 3-193L-FW: TGTCTTCTTAAAGTACGGAAATTAC (配列番号 80) 3-PmaCI-RV: GAGCACAAATGCACGTGGGTGG (配列番号 81)	(2) 約 190bp
	(3) (1)、(2)のPCR断片	(3) 3-NcoI-FW: TGACATTGACATCCACCATGGTG (配列番号 78) 3-PmaCI-RV: GAGCACAAATGCACGTGGGTGG (配列番号 81)	(3) 約 260bp

Expand(High fidelity PCR System (Roche))のプロトコールに従って PCR 反応を行った。鑄型に用いた pEAK-HDAC3 (pMH118)は pEAK10 に HDAC3 CDS 全長が挿入されたプラスミドである。

5 Topo TA cloning kit for sequence (Invitrogen 社) を用い、得られた PCR product (3) をそれぞれ TOP0 cloning vector for sequence にサブクローニングした (pCR4-HDAC3 (H134K, H135L) および pCR4-HDAC3 (H193L))。シーケンシングにより変異導入を確認した PCR 断片を、以下の手順で HDAC3 発現用プラスミド (pMH118) に挿入した。

HDAC3 ドミナントネガティブ変異体 (H134K, H135L)

10 pBluescriptII KS(-) (TOYOBO) (EcoRI/KpnI) (約 3kbp) に pMH118 の EcoRI/KpnI 処理断片 (約 1.3kbp) を挿入し、pBKS-HDAC3 を得た。続いて、pBKS-HDAC3 (BglIII/NcoI) (約 3kbp) に pCR4-HDAC3 (H134K, H135L) (BglIII/NcoI) 約 180bp を挿入し、pBKS-HDAC3 (H134K, H135L) を得た。最後に、pBKS-HDAC3 (H134K, H135L) (EcoRI/KpnI) 約 1.3kbp を pMH118 の  
15 EcoRI/KpnI 処理断片 (約 5.7kbp) に挿入し、pEAK-HDAC3 (H134K, H135L) を得た。HDAC3 ドミナントネガティブ変異体 (H134K, H135L) のコード領域における塩基配列を配列番号 17 として、そのアミノ酸配列を配列番号 18 として示す。

HDAC3 ドミナントネガティブ変異体 (H193L)

20 pMH118 (NcoI/PmaCI) 約 7kbp に pCR4-HDAC3 (H134K, H135L) (NcoI/PmaCI) 約 260bp を挿入し、pEAK-HDAC3 (H193L) を得た。HDAC3 ドミナントネガティブ変異体 (H193L) のコード領域における塩基配列を配列番号 19 として、そのアミノ酸配列を配列番号 20 として示す。

25 実施例 9 : HDAC4 ドミナントネガティブ変異体発現による IL-2 転写活性抑制



ヒト IL-2 プロモーター配列（転写開始点近傍の-674 ~ +54 の領域）をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミド pGL3 IL2 Pro43 1  $\mu$ g と pRL-TK(Promega) 6  $\mu$ g に、野生型 HDAC4 または実施例 3 にて作製した HDAC4 ドミナントネガティブ変異体（H802K H803L, H863L）  
5 発現用プラスミドを量比を変えて（1, 3, 10  $\mu$ g）混和し、エレクトロポレーション法（BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 300V、電荷 975  $\mu$ F、400  $\mu$ L）により、 $1 \times 10^7$  cells の Jurkat 細胞（ATCC, TIB-152）を形質転換した。

形質転換後、2.5 mL の 10 % FBS(MOREGATE)を含む RPMI 1640 (10 % FBS RPMI 1640) を加え、50  $\mu$ L/well の割合で、96well white plate に分注  
10 した。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 10 時間培養後、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, SIGMA)、Ionomycin(SIGMA)、Anti CD28 antibody (Pharmingen) を 10 % FBS RPMI 1640 で混合した液を 50  $\mu$ L/well ずつ加え（終濃度それぞれ 50 ng/mL、1  $\mu$ g/mL、75 ng/mL）、Jurkat 細胞を刺激した。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 12 時間培養後、Bright-Glo  
15 Luciferase Assay System (Promega) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター(1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC) により測定した。

その結果、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体（H802K H803L, H863L）の発現量依存的な IL-2 転写抑制が認められた（図 8）。導入した HDAC  
20 の発現量は抗 Flag 抗体(SIGMA, anti Flag M2)を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

以上より、HDAC4 の機能を選択的に抑制することによって、IL-2 の転写が抑制されることが示唆された。

25 実施例 10 : HDAC4 ドミナントネガティブ変異体発現による細胞増殖抑制

野生型 HDAC4 および実施例 6 にて作製した HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) 発現用プラスミド 10  $\mu$ g を Jurkat, HEL, 293 細胞にトランスフェクションした。

Jurkat 細胞 (ATCC, TIB-152) はエレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 300V、電荷 975  $\mu$ F、400  $\mu$ L) により、  
5  $1 \times 10^7$  cells の細胞を形質転換した。形質転換後、2.5 mL の 10 % FBS (MOREGATE) を含む RPMI 1640 (10 % FBS RPMI 1640) を加え、50  $\mu$ L/well の割合で、96well white plate に分注した。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 5 時間培養後、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, SIGMA)、Ionomycin (SIGMA)、  
10 Anti CD28 antibody (Pharmingen) を 10 % FBS RPMI 1640 で混合した液を 50  $\mu$ L/well ずつ加え (終濃度それぞれ 50 ng/mL、1  $\mu$ g/mL、75 ng/mL)、Jurkat 細胞を刺激した。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 4 時間培養後に Cell Counting Kit-8 (DOJIN) を用いて確認した。

HEL 細胞 (受託番号 JCRB0062、JCRB) はエレクトロポレーション法  
15 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 1750V、電荷 10  $\mu$ F、365  $\mu$ L) により、 $8.75 \times 10^8$  cells の細胞を形質転換した。形質転換後、2 mL の 10 % FBS RPMI 1640 を加え、50  $\mu$ L/well の割合で、96well white plate に分注した。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 10 時間培養後、10 % FBS RPMI 1640 培地を 50  $\mu$ L/well ずつ加え、さらに 12 時間培養後に Cell Counting  
20 Kit-8 (DOJIN) を用いて確認した。

293 細胞 (ATCC, CRL-1573) は、リン酸カルシウム法にてトランスフェクションし (10 % FBS を含む DMEM (SIGMA) 培地にて培養中の 293 細胞に DNA-リン酸カルシウム混液を添加し、6 時間後に培地交換)、37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 48 時間培養後に Cell Counting Kit-8 (DOJIN) を用  
25 いて確認した。

その結果、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体発現 (H863L) による Jurkat 細胞特異的な細胞増殖阻害が認められた (図 9)。各細胞に関して、導入した HDAC 発現量は抗 Flag 抗体 (SIGMA, anti Flag M2) を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。

- 5     以上より、HDAC4 の機能を選択的に阻害することで、T 細胞系の増殖が選択的に抑制されることがわかった。

実施例 11 : HDAC1, 3, 4 ドミナントネガティブ変異体発現による IL-2 および GATA-1 転写活性に及ぼす影響

- 10     実施例 6、7、8 にて作製した HDAC1, 3, 4 のドミナントネガティブ変異体発現時における IL-2 および GATA-1 転写活性を測定した。

- Jurkat 細胞 (ATCC, TIB-152) に関しては、各種 HDAC または HDAC 変異体発現用プラスミド 10  $\mu$ g をエレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 300V、電荷 975  $\mu$ F、400  $\mu$ L) により  $1 \times 10^7$  cells を
- 15     形質転換した。形質転換後、2.5 mL の 10 % FBS (MOREGATE) を含む RPMI 1640 (SIGMA) (10 % FBS RPMI 1640) を加え、50  $\mu$ L/well の割合で、96well white plate に分注した。37 °C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 10 時間培養後、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, SIGMA)、Ionomycin (SIGMA)、Anti CD28 antibody (Pharmingen) を 10 % FBS RPMI
- 20     1640 で混合した液を 50  $\mu$ L/well ずつ加え (終濃度それぞれ 50 ng/mL、1  $\mu$ g/mL、75 ng/mL)、Jurkat 細胞を刺激した。37 °C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 12 時間培養後、Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター (1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC) により
- 25     IL-2 転写活性を測定した。

HEL 細胞 (受託番号 JCRB0062、JCRB) に関しては pGL3-HSI-IE Pro 15  $\mu$ g および各種 HDAC または HDAC 変異体発現用プラスミド 10  $\mu$ g をエレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 1750V、電荷 10  $\mu$ F、365  $\mu$ L) により  $8.75 \times 10^6$  cells を形質転換した。形質転換後、2 mL  
5 の 10 % FBS RPMI 1640 を加え、50  $\mu$ L/well の割合で、96well white plate に分注した。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 3 時間培養後、10 % FBS RPMI 1640 培地を 50  $\mu$ L/well ずつ加えた。37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で 8 時間培養後、Bright-glo Luciferase Assay System のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより GATA-1 転写活性を測定した。  
10

その結果、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K H803L, H863L) 発現時のみに IL-2 転写抑制が認められ、その際に GATA-1 転写抑制は認められないことがわかった (図 10)。各細胞に関して、導入した HDAC 発現量は抗 Flag 抗体 (SIGMA, anti Flag M2) を用いたウエスタンブロッ  
15 ティングにより確認した。

以上より、HDAC4 の機能を選択的に阻害することで血小板減少を伴わずに免疫機能を抑制することが可能であることが示唆された。

#### 実施例 12 : HDAC4 の複合体形成

20 Mol. Cell, Vol. 9, p. 45-57, 2002 では、Class II HDACs が N-CoR および HDAC3 と複合体を形成しており、ヒストンを基質とした HDAC 活性は、Class II HDACs よりも HDAC3 がはるかに強いと報告されている。そこで、粗精製した Class II HDACs の複合体形成について確認した。

HDAC4, 5, 7 発現用プラスミド 7  $\mu$ g をそれぞれ PEAK Rapid 細胞 (Edge  
25 BioSystems) にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションし、48 時間後、whole cell lysate (25mM Tris pH7.4, 150mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1%

Triton X-100 中で細胞を破碎、遠心分離により cell debris を除去)を抗 Flag 抗体カラム (SIGMA, anti Flag M2-agarose) にて粗精製した (TBS で wash した後、0.1M Glycine-HCl pH3.5 にて溶出)。次いで、粗精製画分を SDS-PAGE 後 CBB 染色した。

- 5      その結果、導入した HDAC4, 5, 7 の発現が確認された (図 1 1)。また、HDAC4, 5, 7 の粗精製画分それぞれに HDAC3 および N-CoR が含まれることが、ウエスタンブロッティングにより確認された (抗 HDAC3 抗体は SIGMA 社、抗 N-CoR 抗体は Santa Cruz 社の製品を使用)。

10      以上より、粗精製した HDAC4, 5, 7 は N-CoR および HDAC3 と複合体を形成していることが確認された。

#### 実施例 1 3 : HDAC4 ドミナントネガティブ変異体の複合体形成能

- Mol. Cell, Vol. 9, p. 45-57, 2002 より、HDAC4 変異体には N-CoR および HDAC3 との複合体を形成しないものがあるとの報告がある。そこで、  
15      HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) の複合体形成能について確認した。

- 野生型 HDAC4 および HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) 発現用プラスミド 7  $\mu$ g を PEAK Rapid 細胞 (Edge BioSystems) にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションし、48 時間後、whole cell lysate (25mM  
20      Tris pH7.4, 150mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 中で細胞を破碎し、遠心分離により cell debris を除去)を抗 Flag 抗体カラム (SIGMA, anti Flag M2-agarose) にて粗精製した (TBS で洗浄した後、0.1M Glycine-HCl pH3.5 にて溶出)。次いで、粗精製画分を SDS-PAGE 後 CBB 染色した。

- 25      その結果、導入した HDAC4 および HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) の発現が確認された (図 1 2)。また、HDAC4 の粗精製画分に HDAC3

および N-CoR が含まれること、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) の粗精製画分には HDAC3 および N-CoR がほとんど含まれないことが、ウエスタンブロッティングにより確認された (抗 HDAC3 抗体は SIGMA 社、抗 N-CoR 抗体は Santa Cruz 社の製品を使用)。

- 5     以上より、野生型 HDAC4 と比較して HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) は、N-CoR および HDAC3 との複合体形成能が低下していることがわかった。

#### 実施例 14 : HDAC 活性の測定

- 10     Mol. Cell, Vol. 9, p. 45-57, 2002 より、N-CoR および HDAC3 との複合体形成能が低下している HDAC4 変異体は、ヒストンを基質とした HDAC 活性の低下が認められるとの報告がある。そこで、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K H803L, H863L) のヒストンを基質とした HDAC 活性を測定した。
- 15     野生型 HDAC4 および HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K H803L, H863L) 発現用プラスミド 7  $\mu$ g を 293T 細胞にリン酸カルシウム法にてトランスフェクションし、48 時間後、whole cell lysate (25mM Tris pH7.4, 150mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 中で細胞を破碎、遠心分離により cell debris を除去) を抗 Flag 抗体カラム (SIGMA, anti Flag
- 20     M2-agarose) にて粗精製し (TBS で wash した後、0.1M Glycine-HCl pH3.5 にて溶出)、HDAC 活性測定に用いた。反応基質は、[<sup>3</sup>H]酢酸ナトリウム 300MBq (NENTM Life Science Products, Inc.) を含む RPMI (SIGMA) 培地 40mL 中で 2 時間培養した Jurkat 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells) を Lysis buffer
- 25     10mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 8.6% Sucrose) 中で破碎し、Wash buffer (10mM Tris-HCl,

13mM EDTA)にて洗浄した後、0.4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加、調製した[<sup>3</sup>H]ラベルされたアセチル化ヒストンを用いた。

その結果、野生型 HDAC4 と比較して、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体(H802K H803L, H863L)では HDAC 活性の低下が認められた(図 1 3)。

- 5     以上より、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K H803L, H863L) は、N-CoR および HDAC3 との複合体形成能が低下しており(実施例 1 3)、それに伴ってヒストンを基質とした HDAC 活性が低下していることが確認された。

10     実施例 1 5 : HDAC4 と N-CoR との相互作用の検出系の構築

野生型 HDAC4 と比較して、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体(H863L)が N-CoR との複合体形成能が低下していることがわかったため、HDAC4 と N-CoR との相互作用を阻害することで、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体発現時と同様の IL-2 転写抑制作用が発揮されると考えた。

- 15     そこで、HDAC4 と N-CoR との相互作用を阻害する薬物のスクリーニング系を構築するため、CheckMate Mammalian Two-Hybrid System (Promega) を利用することとした(図 1 4)。

まず、Mol. Cell, 2002, Vol. 9, p. 45-57 の文献情報よりヒト N-CoR の RD3 配列相当部位を決定した(1005-1498a. a.)。ヒト N-CoR CDS 塩基配列は  
20     GenBank の accession 番号 AF044209 より入手し、ヒト肺由来 cDNA から PCR 法によりヒト N-CoR(RD3) cDNA を増幅した。プライマーは、下記 RD3-Bam-FW (配列番号 8 2) 及び RD3-Not-RV (配列番号 8 3) を用いた。ヒト N-CoR(RD3) の塩基配列については配列番号 2 1、ヒト N-CoR(RD3) の塩基配列がコードするアミノ酸配列については配列番号 2 2 を参照の  
25     こと。得られた PCR 断片をシーケンシングにより確認し (N-CoR(RD3) に関しては L1014V の変異が認められたが SWISS-PROT にて variant として

の報告があったため採用とした)、制限酵素処理 (BamHI/NotI) によって pBIND (Promega) に挿入し、GAL4-N-CoR (RD3) 発現用プラスミドを得た。また、HDAC4 および HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) 全長を制限酵素処理 (XbaI/NotI) によって pACT (Promega) に挿入し、HDAC4-VP16 およ  
5 び HDAC4 (H863L)-VP16 発現用プラスミドを得た。

RD3-Bam-FW: GGGATCCGTGAAGTCCTTCAGCCTGCTCC (配列番号 8 2)

RD3-Not-RV: TGCGGCCGCCATGGGTGAGCCTCTGGACA (配列番号 8 3)

続いて、pG5-Luc (Promega) 10  $\mu$ g, pBND 3  $\mu$ g, pACT 3  $\mu$ g または pG5-Luc 10  $\mu$ g, pBND-N-CoR (RD3) 3  $\mu$ g, pACT-HDAC4 3  $\mu$ g または pG5-Luc 10  $\mu$ g, 10 pBND-N-CoR (RD3) 3  $\mu$ g, pACT-HDAC4 (H863L) 3  $\mu$ g をそれぞれ混和し、エレクトロポレーション法 (BIO-RAD, Gene Pulser II, 電圧 300V、電荷 975  $\mu$ F、400  $\mu$ L) により Jurkat 細胞 (ATCC, TIB-152)  $1 \times 10^7$  cells にトランスフェクションした。トランスフェクション 22 時間後に Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) のマニュアルに従い、  
15 細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター (1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC) により測定した。

その結果、N-CoR (RD3) と HDAC4 の相互作用による GAL4 転写活性化が検出され、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H863L) が N-CoR (RD3) と相互作用しないことが確認された (図 1 5)。

20 以上より、HDAC4 と N-CoR (RD3) との相互作用の検出系が構築できたと判断した。

#### 実施例 1 6 : siRNA を用いた HDAC4 選択的な遺伝子発現抑制の IL-2 及び GATA-1 転写活性に及ぼす影響

25 Jurkat 細胞に、HDAC4 を標的とする 4 種類の siRNA の mixture である siGENE HDAC4 SMARTpool (Dharmacon Inc. 製, B-Bridge international



Inc. 販売, コード番号 M-003497-00-05) または Non-specific Control Duplex IX (47% GC content) (Dharmacon Inc. 製, B-Bride international Inc. 販売, コード番号 D-001206-09-20)、及び pGL3 IL2 Pro43 を、前述と同様のエレクトロポレーション法により導入し、IL-2 転写活性を測定した。同様にして、HEL 細胞に、siGENE HDAC4 SMARTpool または Non-specific Control Duplex IX、及び pGL3-HSI-IE Pro を導入し、GATA-1 転写活性を測定した。なお、Jurkat 細胞および HEL 細胞における siRNA の導入条件およびその効果は、pGL3-control (Promega) および Luciferase GL3 Duplex (B-Bride: D-001400-01-20) を用いることで予め確認した。

その結果、HDAC4 遺伝子発現の選択的な抑制により IL-2 転写抑制が認められたが、GATA-1 転写抑制は認められなかった (図 16)。

以上より、HDAC4 の機能を選択的に阻害することで血小板減少を伴わずに免疫機能を抑制し得ることが再度示唆された。

15

#### 産業上の利用可能性

本発明により、各種 HDAC の中でも HDAC4/HDAC8 を選択的に抑制すると、血小板減少作用及び／又は GATA-1 産生阻害活性をあまり示すことなく、免疫を抑制し得ること、IL-2 産生を阻害し得ること、又は免疫担当細胞の増殖を抑制し得ることが明らかとなった。従って、HDAC4/HDAC8 を選択的に抑制する化合物を選択することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤、又は免疫担当細胞増殖阻害剤を従来よりも簡便かつ短時間で選択することが可能になる。以上より、本発明の方法は新薬創製のための研究に極めて有用である。

25

本出願は、２００２年１２月２７日に日本で出願された特願２００２－３７８８００を基礎としており、その内容は本明細書中に援用される。

## 請 求 の 範 囲

1. HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤。
- 5 2. HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。
  3. GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であって、被験物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定することを含む選択方法。
- 10 4. 血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定することを含む選択方法。
  5. 以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法：
    - (i) 被験物質の HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素阻害活性を測定する；
    - 15 (i i) 被検物質の HDAC 酵素阻害活性を測定する、ここで、該 HDAC 酵素阻害活性が、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6 又は HDAC7 酵素阻害活性からなる群より選択される 1 以上の HDAC 酵素阻害活性である。
  6. 以下 (i) ～ (i i i) の工程を含む、GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤の選択方法であ
- 20 7. 該 IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤が HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、請求項 3 記載の方法：
  - (i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8 の各遺伝子を発現させて、酵素液を得る；
  - 25 (i i) 当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定する；

( i i i ) HDAC4 遺伝子又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に HDAC 酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

7. 以下 ( i ) ~ ( i i i ) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤が HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、請求項 4 記載の方法：

( i ) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8 の各遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

- ( i i ) 当該各酵素液のそれぞれを被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定する；

( i i i ) HDAC4 遺伝子又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に HDAC 酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

8. 以下 ( i ) ~ ( i i i ) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、該免疫抑制剤が HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素活性を選択的に阻害することを特徴とする、請求項 4 記載の方法：

( i ) ヒト細胞から部分精製された酵素液を被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定する；

- ( i i ) HDAC4 遺伝子及び／又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を被験物質と共存させ、HDAC 酵素活性を測定する；

( i i i ) ( i ) と ( i i ) との酵素活性を比較し、HDAC4 遺伝子及び／又は HDAC8 遺伝子を発現させることにより得られた酵素液を用いた場合にのみ選択的に HDAC 酵素活性を抑制する被験物質を選択する。

9. 以下 ( i ) ~ ( i i i ) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 と N-CoR

との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法：

(i) HDAC4 遺伝子及び N-CoR 遺伝子を発現させて、酵素液を得る；

(i i) 当該酵素液を被験 HDAC 阻害剤と共存させる；

- 5 (i i i) (i i) で得られた酵素液と被験 HDAC 阻害剤の混合液において HDAC4 と N-CoR との複合体が形成されているか否かを解析する。

10 以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 蛋白質の少なくとも一部を含む HDAC4 融合蛋白質と、N-CoR 蛋白質の少なくとも一部を含む N-CoR 融合蛋白質との複合体形成を特異的に阻害するものを選択することを特徴とする方法：

(i) 該 HDAC4 融合蛋白質をコードする遺伝子、及び該 N-CoR 融合蛋白質をコードする遺伝子を細胞内で発現させる；

- 15 (i i) 被験 HDAC 阻害剤が、該 HDAC4 融合蛋白質と該 N-CoR 融合蛋白質との複合体形成を阻害するか否かを解析する。

11. 以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、HDAC4 及び／又は HDAC8 の発現量を抑制するものを選択することによる方法：

- 20 (i) HDAC4 及び／又は HDAC8 を発現する細胞と被験 HDAC 阻害剤を共存させる；

(i i) 当該細胞における HDAC4 及び／又は HDAC8 発現量を測定する。

12. 以下 (i) (i i) の工程を含む、血小板減少作用の少ない免疫抑制活性を有する化合物の選択方法であって、被験 HDAC 阻害剤のうち、  
25 HDAC4 及び／又は HDAC8 と HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドとの結合を選択的に阻害するものを選択することによる方法：

- (i) HDAC4 及び／又は HDAC8 遺伝子を発現させて、酵素液を得る；
- (ii) 当該酵素液を HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドと被験 HDAC 阻害剤と共存させ、HDAC4 及び／又は HDAC8 酵素と HDAC4 及び／又は HDAC8 特異的リガンドとの結合活性を測定する。
- 5 13. 以下 (i) (ii) を少なくとも含む、HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット：
- (i) HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC5、HDAC6、HDAC7 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液；
- 10 (ii) HDAC4 及び／又は HDAC8 の各遺伝子を発現させて得られた酵素液。
14. 配列番号 4 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA。
- 15 15. 配列番号 4 又は配列番号 6 に記載のアミノ酸配列であることを特徴とする HDAC4 変異体。
16. 有効量の HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を被験体に投与する工程を含む、GATA-1 産生阻害活性が少ない IL-2 産生及び／又は免疫担当細胞増殖の阻害方法。
- 20 17. 有効量の HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤を被験体に投与する工程を含む、血小板減少作用が少ない免疫の抑制方法。
18. GATA-1 産生阻害活性の少ない IL-2 産生阻害剤及び／又は免疫担当細胞増殖阻害剤の製造のための HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤の使用。
- 25 19. 血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の製造のための HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤の使用。

1/11

☒ 1

661' ATCAGTATCCTTGAATCGAAACCTTTTCTGAGTATTTAACAATCGCACCCCTTTAAAAAA  
\*\*\*\*\*  
1" CTGAGTATTTAACAATCGCACCCCTTTAAAAAA

721' TGTAC-ATAGACATTAAGAGACTTAAACAGATATATAATCATTTTAAATTAAAAAGCGT  
\*\*\*\*\*  
33" TGTACAATAGACATTAAGAGACTTAAACAGATATATAATCATTTTAAATTAAAAAGCGT

780' TAAACAGTACCTCAAGCTCAATAAGCATTTTAAAGTATTCTAATCTTAGTATTTCTCTAGC  
\*\*\*\*\*  
93" TAAACAGTACCTCAAGCTCAATAAGCATTTTAAAGTATTCTAATCTTAGTATTTCTCTAGC

840' TGACATGTAAGAAGCAATCTATCTTATTGTATGCAATTAGCTCTTTGTGTGGATAAAAAAG  
\*\*\*\*\*  
153" TGACATGTAAGAAGCAATCTATCTTATTGTATGCAATTAGCTCATTTGTGTGGATAAAAAAG

900' GTAAACCATTTCTGAAACAGGAAACCAATACACTTCCTGTTAATCAACAAATCTAAACA  
\*\*\*\*\*  
213" GTAAACCATTTCTGAAACAGGAAACCAATACACTTCCTGTTAATCAACAAATCTAAACA

960' TTTATTCTTTTCATCTGTTTACTCTTGCTCTTGCTCCACCACAATATGCTATTCATGTT  
\*\*\*\*\*  
273" TTTATTCTTTTCATCTGTTTACTCTTGCTCTTGCTCCACCACAATATGCTATTCATGTT

1020' CAGTGTAGTTTATGACAAAGAAAATTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCTTAA  
\*\*\*\*\*  
333" CAGTGTAGTTTATGACAAAGAAAATTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCTTAA

1080' AGAAAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTTAATTGCATGAATTAGAGCTATCAC  
\*\*\*\*\*  
393" AGAAAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTTAATTGCATGAATTAGAGCTATCAC

1140' CTAAGTGTTGGGCTAATGTAACAAAGAGGGATTTCACCTACATCCATTAGTCAGTCTTTG  
\*\*\*\*\*  
453" CTAAGTGTTGGGCTAATGTAACAAAGAGGGATTTCACCTACATCCATTAGTCAGTCTTTG

1200' GGGGTTTAAAGAAATTCAAAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTC  
\*\*\*\*\*  
513" GGGGTTTAAAGAAATTCAAAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTC

1260' AGACTGGTAAAGTCTTTGAAAATATGTGTAATATGTAAAACATTTTGACACCCCCATAAT  
\*\*\*  
573" AGACAGGTAAAGTCTTTGAAAATATGTGTAATATGTAAAACATTTTGACACCCCCATAAT

1320' ATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTCCCTATCA-CTC  
\*\*\*\*\*  
633" ATTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTCCCTATCACTCTC

1378' TTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAGGATGCAACTCCTGT  
\*\*\*\*\*  
693" TTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAA

901' TAAAACCATTCTGAAACAGGAAACCAATACACTTCCTGTTTAATCAACAAATCTAAACAT  
1" GGGNNNNNGGNGATCCTCTACCACTATAGGGCGAATTGAATTAGCG  
961' TTATTCTTTTCATCTGTTTACTCTTGCTCTTGTCACCACAATATGCTATTCACATGTTG  
\*\*\*\*\*  
49" GCCGCGANTTCGCCCTTCGCTAGCTGCTCTTGTCACCACAATATGCTATTCACATGTTG  
1021' AGTGTAGTTTATGACAAAGAAAATTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCTTAAA  
\*\*\*\*\*  
109" AGTGTAGTTTATGACAAAGAAAATTTCTGAGTTACTTTTGTATCCCCACCCCTTAAA  
1081' GAAAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTTAATTGCATGAATTAGAGCTATCACC  
\*\*\*\*\*  
169" GAAAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTTAATTGCATGAATTAGAGCTATCACC  
1141' TAAGTGTGGGCTAATGTAACAAAGAGGGATTTACCTACATCCATTGAGTCAGTCTTTGG  
\*\*\*\*\*  
229" TAAGTGTGGGCTAATGTAACAAAGAGGGATTTACCTACATCCATTGAGTCAGTCTTTGG  
1201' GGGTTTAAAGAAATTCCAAAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTCA  
\*\*\*\*\*  
289" GGGTTTAAAGAAATTCCAAAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATGAAGGTAATGTTTTTCA  
1261' GACTGGTAAAGTCTTTGAAAAATATGTGTAATATGTAAACATTTTGACACCCCATATA  
\*\*\* \*\*\*\*\*  
349" GACAGGTAAAGTCTTTGAAAAATATGTGTAATATGTAAACATTTTGACACCCCATATA  
1321' TTTTCCAGAAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCTATCA—CTCT  
\*\*\*\*\*  
409" TTTTCCAGAAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCTATCACTCTCT  
1379' TTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAGGATGCAACTCCTGTC  
\*\*\*\*\*  
469" TTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAAGCTTCGAAGGGCGAATTCGTT



## 図 3

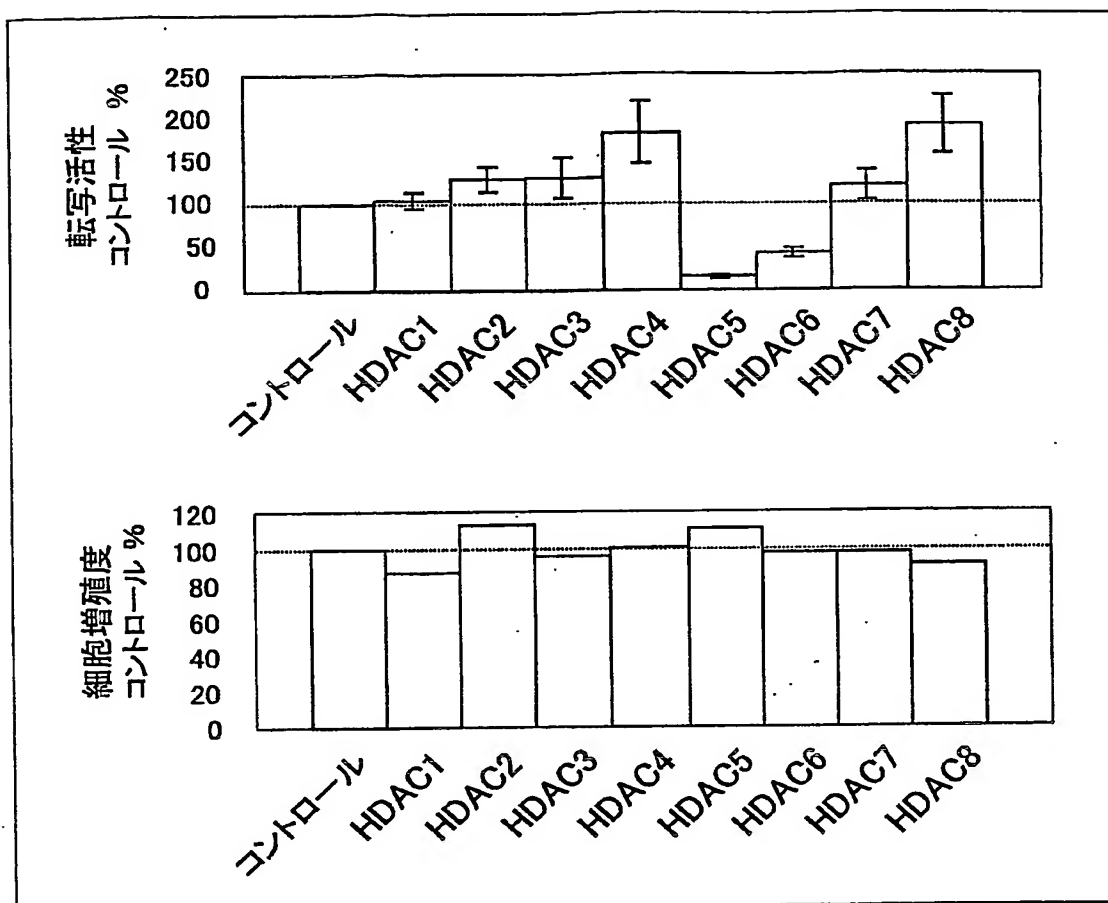
5281' GCCTCTGTCTCTCCCACTCCACCCCTTCTCTTCTACCTATCCCACTCCTCGAGGAATCATCCCTGGCTCCCACTCA  
\*\*\*\*\*  
1" TGCCTCTTTACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGGAATTCGCCCTTGATCTATCCCTGGCTCCCACTCA  
5361' GTTTCGGCCTCCAAGGCAGCATGGCGGGCAAGAAGTTGAGGCCACTGTCCCTGGGTGTTCTACCCCAACCCCTCACC  
\*\*\*\*\*  
76" GTTTCGGCCTCCAAGGCAGCATGGCGGGCAAGAAGTTGAGGCCACTGTCCCTGGGTGTTCTACCCCAACCCCTCACC  
5441' CCAAGACAGCCTGTTACTGCGGCGCCAACAGCCACGGTCGCCTACATCTGATAAGACTTATCTGCTGCCCCAGGGCAGGC  
\*\*\*\*\*  
156" CCAAGACAGCCTGTTACTGCGGCGCCAACAGCCACGGTCGCCTACATCTGATAAGACTTATCTGCTGCCCCAGGGCAGGC  
5521' CGGAGCTGGCGTAAGCCCAAGTGGGCGCTAAGTGAGTGTGCCCTGCCTCCCGCCAGCACTGGCCTGGCCTGCAGGCTT  
\*\*\*\*\*  
236" CGGAGCTGGCGTAAGCCCAAGTGGGCGCTAAGTGAGTGTGCCCTGCCTCCCGCCAGCACTGGCCTGGCCTGCAGGCTT  
5601' AGCCTGGGTCAATCAAGGTATCCCAAGGCTCTAGTTCAAATCCAGCAGAACCTCTCTGAGCCTCACTCTTCTCACCTGCA  
\*\*\*\*\*  
316" AGCCTGGGTCAATCAAGGTATCCCAAGGCTCTAGTTCAAATCCAGCAGAACCTCTCTGAGCCTCACTCTTCTCACCTGCA  
5681' AAATGGGTACAGCCACATCCCTTCTCTCCCTGCAGCCAGGAAGACGCACATACACAGGAGTCTAGCCACACCGGCCCG  
\*\*\*\*\*  
396" AAATGGGTACAGCCACATCCCTTCTCTCCCTGCAGCCAGGAAGACGCACATACACAGGAGTCTAGCCACACCGGCCCG  
5761' CACAAATTAAGGGCTTTACTCTCTGAAAAGCCAGTGAAGTCATGAAACCATATCTGCTATTTTCATTATCTTGGTTTC  
\*\*\*\*\*  
476" CACAAATTAAGGGCTTTACTCTCTGAAAAGCCAGTGAAGTCATGAAACCATATCTGCTATTTTCATTATCTTGGTTTC  
5841' AGCCTATTTTGTCTGTCTGGACACTACAGTCCACGGGAGCCTAGGTGAGCGAGGTCCAAGAATCCCAGGGTGGGCAGG  
\*\*\*\*\*  
556" AGCCTATTTTGTCTGTCTGGACACTACAGTCCACGGGAGCCTAGGTGAGCGAGGTCCAAGAATCCCAGGGTGGGCAGG  
5921' GAGGGTGAAGAGGGCCTCCAGTGCCCAAGAGGTGCCCAACAAGCATGGGACCCGCCCTCCCTGGACTGCCCCACCC  
\*\*\*\*\*  
636" GAGGGTGAAGAGGGCCTCCAGTGCCCAAGAGGTGCCCAACAAGCATGGGACCCGCCCTCCCTGGACTGCCCCACCC  
6001' ACTGGGGCACCAGCCACTCCCTGGGAGGAGGGAGGAGGAGAAGGGAGGGAGGGAGGGAGGAAGGGAGCCTCAA  
\*\*\*\*\*  
716" ACTGGGGCACCAGCCACTCCCTGGGAGGAGGGAGGAGGAGAAGGGAGGGAGGGAGGGAGGAAGGGAGCCTCAA  
6081' GGCCAAGGCCAGCCAGGACACCCCTGGGATCAGCTTGCCACATCCCAAGGCGCCGAACCTCCGCAACCAC  
\*\*\*\*\*  
796" GGCCAAGGCCAGCCAGGACACCCCTGGGATCAGCTTGCCACATCCCAAGGCGCCGAACCTCCGCAACCAC  
6161' CAGCCCAGGTCACTCAGCCCCAGAGAGCCCCACCAAGGCAACCCTGGGCCTGCTGCCCTACCCTTATGCTTGCTC  
876" CAAAGCTTATAAGGGCGAATTCTGT



2321' GTACAAATGCCATGGGGCTGGACCAAGCAGGGGCTCTAGAACCCAGAAAGATGCCAGGAGGGAGTGAGCCAGTCAGGGA  
\*\*\*\*\*  
1" TTATGGTACCACCCAGAAAGATGCCAGGAGGGAGTGAGCCAGTCAGGGA  
2401' AGGCTTCCGAGAAGAGAGGACATTGAAGAAGAGTCTCAAACCTTAGGCCTGACGGAGAAGACGCGCGGCCAGGACACCCCA  
\*\*\*\*\*  
50" AGGCTTCCGAGAAGAGAGGACATTGAAGAAGAGTCTCAAACCTTAGGCCTGACGGAGAAGACGCGCGGCCAGGACACCCCA  
2481' CCCCCGCTCGTCTCCCCAAAGCCTGATCTGGCCCCACTGATTCCCTTATCTGCCACTCCAGCTGCCTCCTTGCTG  
\*\*\*\*\*  
130" CCCCCGCTCGTCTCCCCAAAGCCTGATCTGGCCCCACTGATTCCCTTATCTGCCACTCCAGCTGCCTCCTTGCTG  
2561' GCTGAACGTGCGCCGAGACTTCTGAGCCTGCGCCCCCTCCACGGGGATGGGGGAGGGAATGGGGTGAGGCCTGCGCTCA  
\*\*\*\*\*  
210" GCTGAACGTGCGCCGAGACTTCTGAGCCTGCGCCCCCTCCACGGGGATGGGGGAGGGAATGGGGTGAGGCCTGCGCTCA  
2641' CAGCCTCGGGGTTTCCAGCTCTTGCTGGAGGCAGGGCTCTGGGGCGCCCTACTCCTCACCTTGGCTTCTCTTCTGAGC  
\*\*\*\*\*  
290" CAGCCTCGGGGTTTCCAGCTCTTGCTGGAGGCAGGGCTCTGGGGCGCCCTACTCCTCACCTTGGCTTCTCTTCTGAGC  
2721' GCTCTGTGCTCTCCAGAAATGAAGAAATGGGGTGAGTCCAGCGGCCAAACCTTGTCTTAGCTCTTAGACATGCCTCGAG  
\*\*\*\*\*  
370" GCTCTGTGCTCTCCAGAAATGAAGAAATGGGGTGAGTCCAGCGGCCAAACCTTGTCTTAGCTCTTAGACATGCCTCGAG  
2801' CCTGCCATTCCCTGTGAGGACAGATTTCCCTATGTTGCGACCGCTGCTTCTAATAATAATAATGATGATGATAATTCCCA  
\*\*\*\*\*  
450" CCTGCCATTCCCTGTGAGGACAGATTTCCCTATGTTGCGACCGCTGCTTCTAATAATAATAATGATGATGATAATTCCCA  
2881' TTTACAGAGCACACCATTATGGTGTGCCAGCAGGCCCTGTGCTGAGTGGTTCTACCCACGTGGGGGGCTAGGACTTTA  
\*\*\*\*\*  
530" TTTACAGAGCACACCATTATGGTGTGCCAGCAGGCCCTGTGCTGAGTGGTTCTACCCACGTGGGGGGCTAGGACTTTA  
2961' CCCCCTTTCCAGATGAAGAAACTGAGGCTCAGAGGGCGTCTGGCCCAGGAATCACACAGCAAATCACACAGCAAATCAGA  
\*\*\*\*\*  
610" CCCCCTTTCCAGATGAAGAAACTGAGGCTCAGAGGGCGCTAGCATAAGGGC

5/11

図 5



6/11

図 6

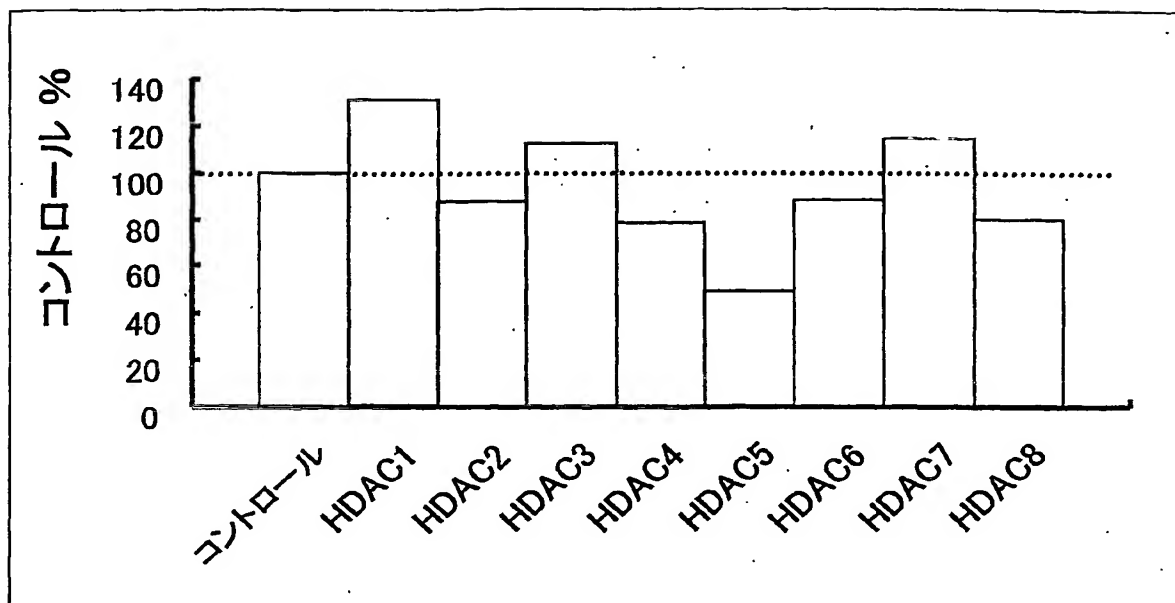


図 7

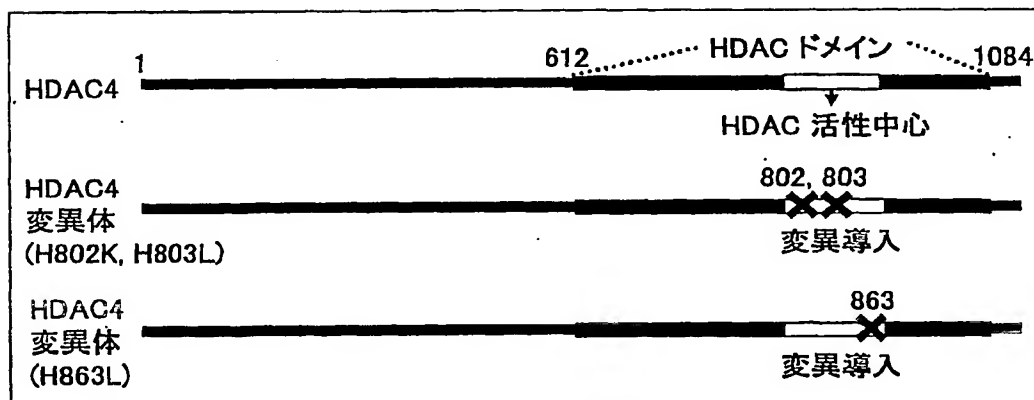


図 8

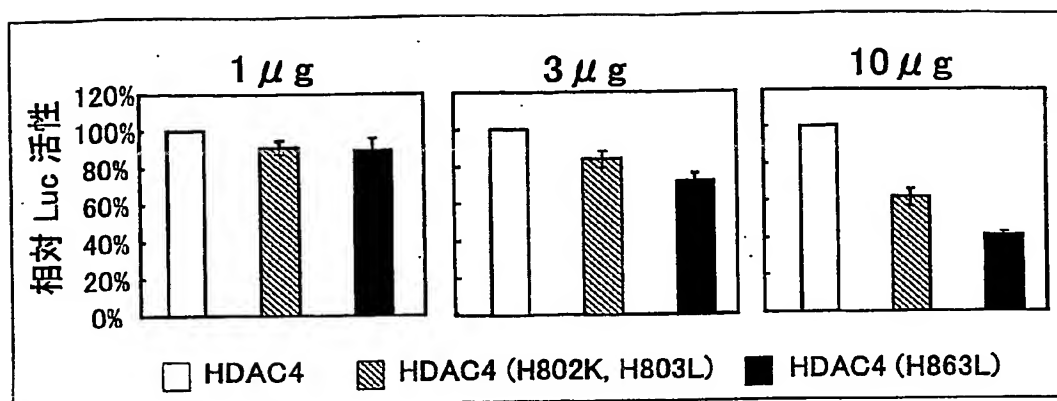


図 9

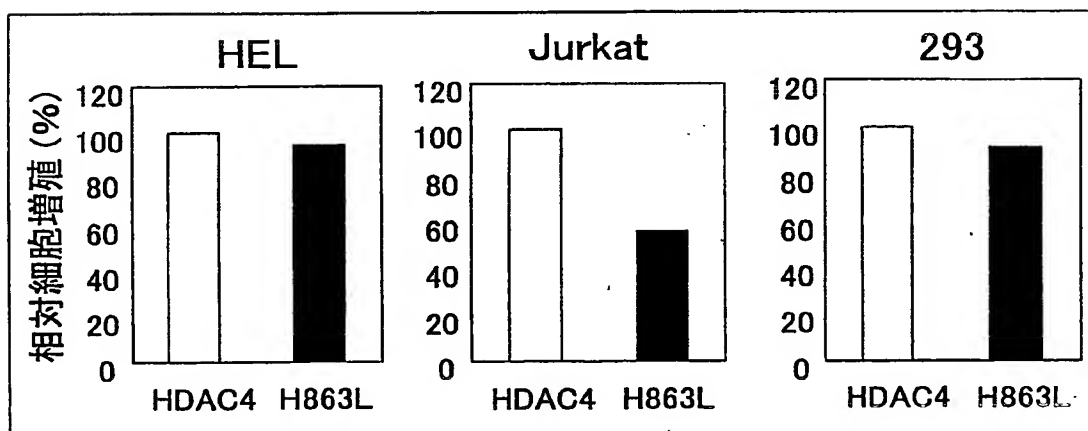


図 10

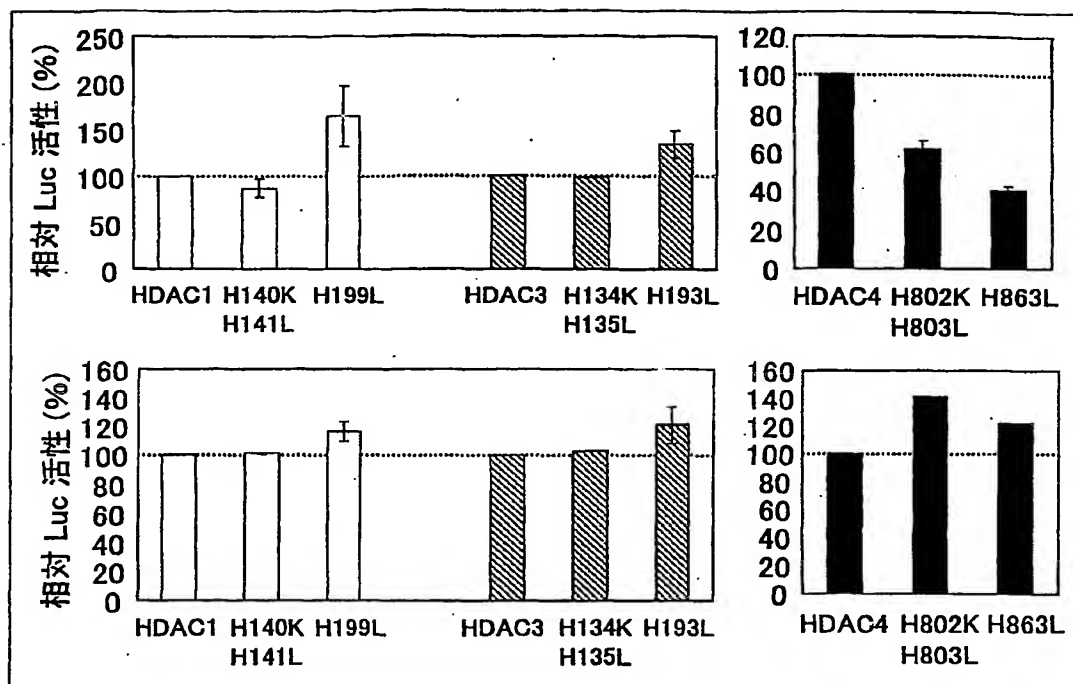
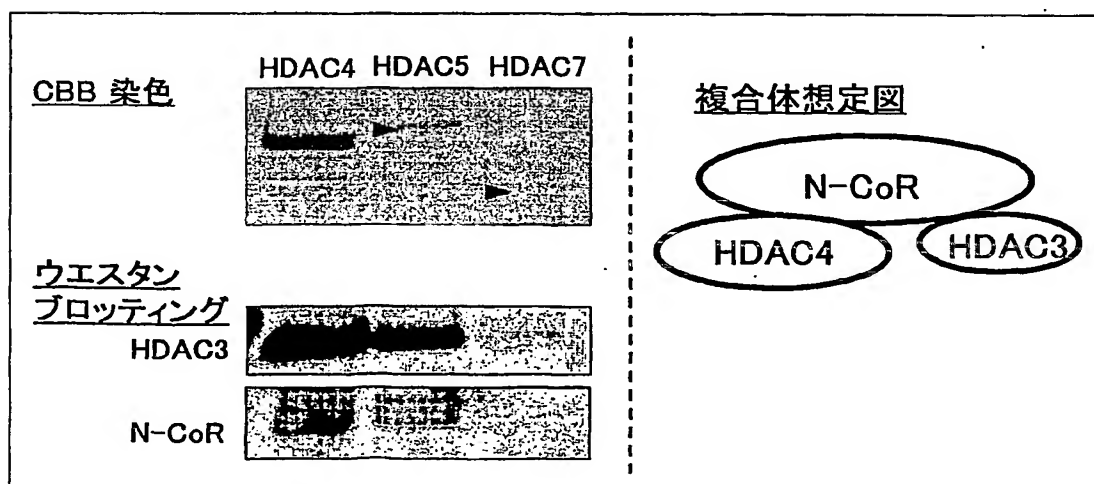


図 11



9/11

図 1 2

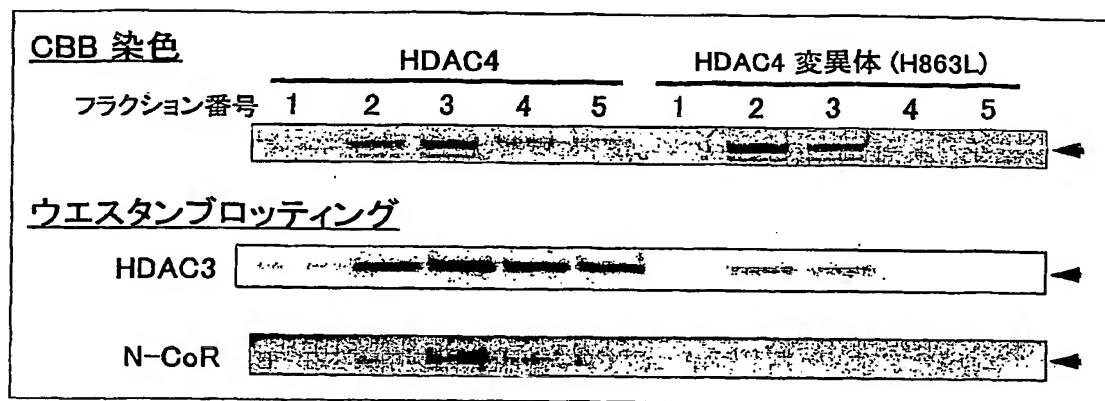


図 1 3

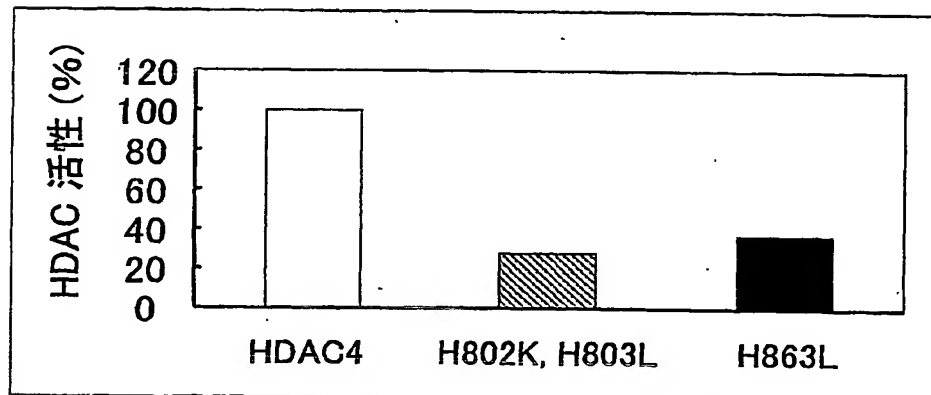


図 1 4

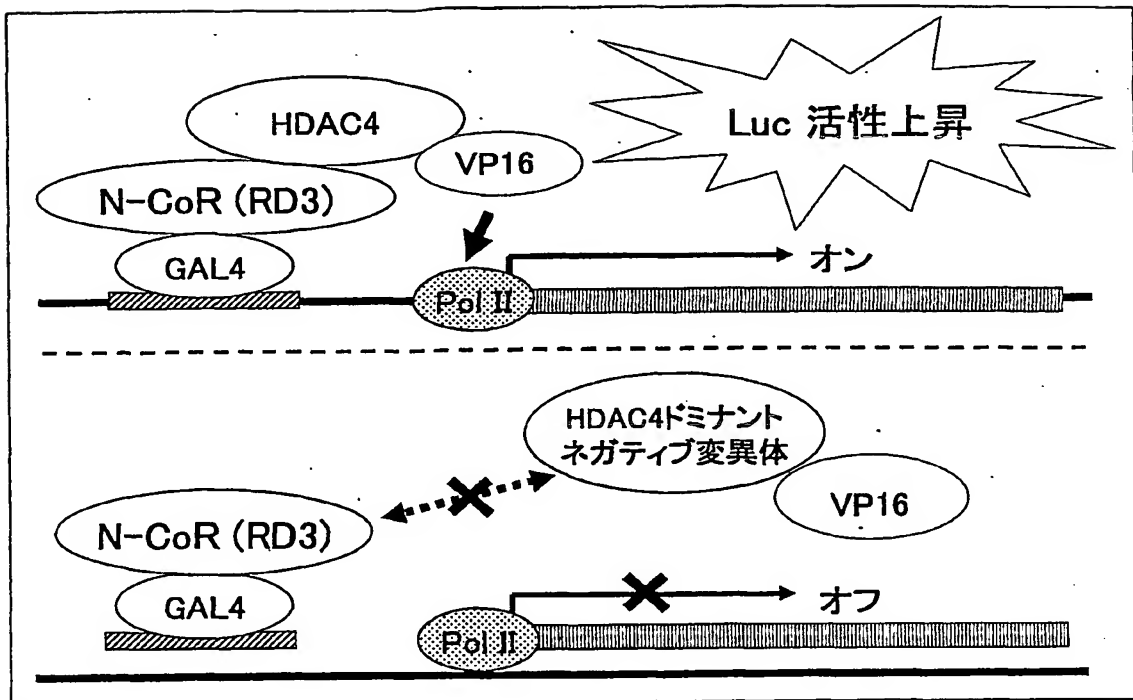
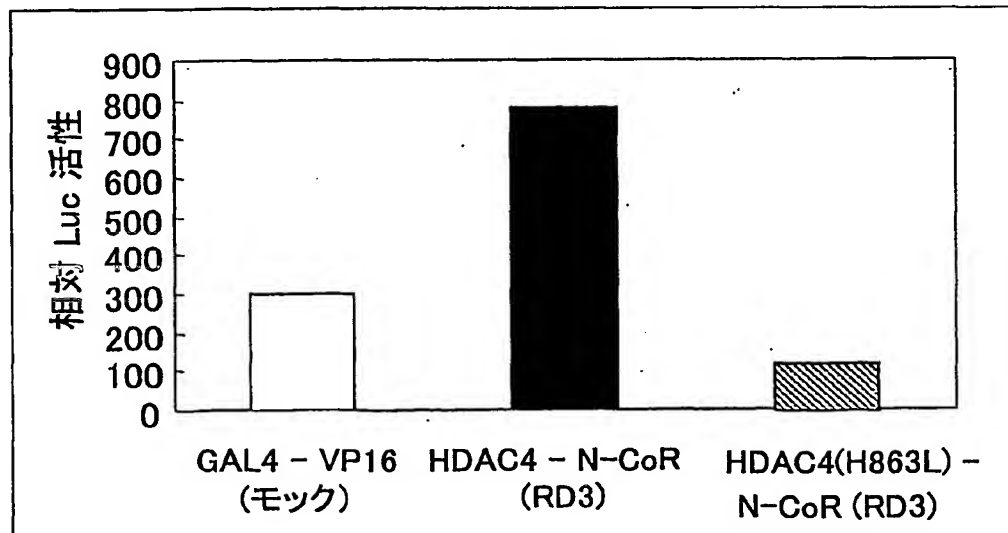


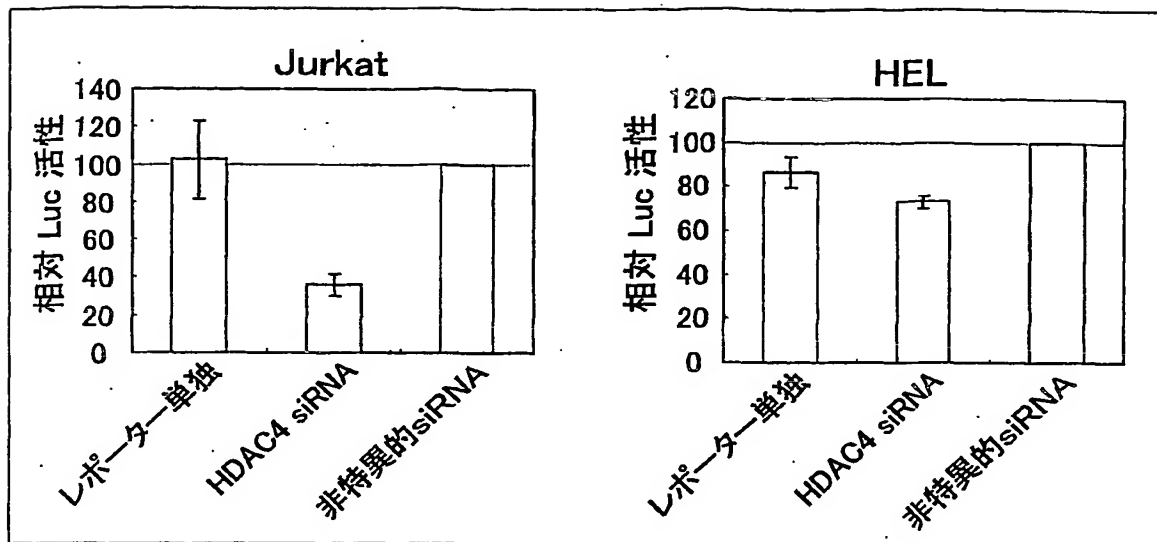
図 1 5





11/11

図 16



1/123

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; New methods for selecting an immunosuppressive agent

&lt;130&gt; 09598

&lt;150&gt; JP2002-378800

&lt;151&gt; 2002-12-27

&lt;160&gt; 86

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3255

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(3255)

&lt;223&gt; human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

&lt;400&gt; 1

atg agc tcc caa agc cat cca gat gga ctt tct ggc cga gac cag cca 48

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro

1 5 10 15

gtg gag ctg ctg aat cct gcc cgc gtg aac cac atg ccc agc acg gtg 96

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val

20 25 30

gat gtg gcc acg gcg ctg cct ctg caa gtg gcc ccc tcg gca gtg ccc 144

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro

35 40 45

2/123

atg gac ctg cgc ctg gac cac cag ttc tca ctg cct gtg gca gag ccg	192
Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro	
50 55 60	
gcc ctg cgg gag cag cag ctg cag cag gag ctc ctg gcg ctc aag cag	240
Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln	
65 70 75 80	
aag cag cag atc cag agg cag atc ctc atc gct gag ttc cag agg cag	288
Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln	
85 90 95	
cac gag cag ctc tcc cgg cag cac gag gcg cag ctc cac gag cac atc	336
His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile	
100 105 110	
aag caa caa cag gag atg ctg gcc atg aag cac cag cag gag ctg ctg	384
Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu	
115 120 125	
gaa cac cag cgg aag ctg gag agg cac cgc cag gag cag gag ctg gag	432
Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu	
130 135 140	
aag cag cac cgg gag cag aag ctg cag cag ctc aag aac aag gag aag	480
Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys	
145 150 155 160	
ggc aaa gag agt gcc gtg gcc agc aca gaa gtg aag atg aag tta caa	528
Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln	
165 170 175	
gaa ttt gtc ctc aat aaa aag aag gcg ctg gcc cac cgg aat ctg aac	576
Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn	
180 185 190	

3/123

cac tgc att tcc agc gac cct cgc tac tgg tac ggg aaa acg cag cac	624
His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His	
195 200 205	
agt tcc ctt gac cag agt tct cca ccc cag agc gga gtg tcg acc tcc	672
Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser	
210 215 220	
tat aac cac ccg gtc ctg gga atg tac gac gcc aaa gat gac ttc cct	720
Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro	
225 230 235 240	
ctt agg aaa aca gct tct gaa ccg aat ctg aaa tta cgg tcc agg cta	768
Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu	
245 250 255	
aag cag aaa gtg gcc gaa aga cgg agc agc ccc ctg tta cgc agg aaa	816
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys	
260 265 270	
gac ggg cca gtg gtc act gct cta aaa aag cgt ccg ttg gat gtc aca	864
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr	
275 280 285	
gac tcc gcg tgc agc agc gcc cca ggc tcc gga ccc agc tca ccc aac	912
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn	
290 295 300	
aac agc tcc ggg agc gtc agc gcg gag aac ggt atc gcg ccc gcc gtc	960
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val	
305 310 315 320	
ccc agc atc ccg gcg gag acg agt ttg gcg cac aga ctt gtg gca cga	1008
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg	
325 330 335	
gaa ggc tcg gcc gct cca ctt ccc ctc tac aca tcg cca tcc ttg ccc	1056

4/123

Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro	
340 345 350	
aac atc acg ctg ggc ctg cct gcc acc ggc ccc tct gcg ggc acg gcg	1104
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala	
355 360 365	
ggc cag cag gac acc gag aga ctc acc ctt ccc gcc ctc cag cag agg	1152
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg	
370 375 380	
ctc tcc ctt ttc ccc ggc acc cac ctc act ccc tac ctg agc acc tcg	1200
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser	
385 390 395 400	
ccc ttg gag cgg gac gga ggg gca gcg cac agc cct ctt ctg cag cac	1248
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His	
405 410 415	
atg gtc tta ctg gag cag cca ccg gca caa gca ccc ctc gtc aca ggc	1296
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly	
420 425 430	
ctg gga gca ctg ccc ctc cac gca cag tcc ttg gtt ggt gca gac cgg	1344
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg	
435 440 445	
gtg tcc ccc tcc atc cac aag ctg cgg cag cac cgc cca ctg ggg cgg	1392
Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg	
450 455 460	
acc cag tcg gcc ccg ctg ccc cag aac gcc cag gct ctg cag cac ctg	1440
Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu	
465 470 475 480	
gtc atc cag cag cag cat cag cag ttt ctg gag aaa cac aag cag cag	1488
Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln	

5/123

485	490	495	
ttc cag cag cag caa ctg cag atg aac aag atc atc ccc aag cca agc			1536
Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser			
500	505	510	
gag cca gcc cgg cag ccg gag agc cac ccg gag gag acg gag gag gag			1584
Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu			
515	520	525	
ctc cgt gag cac cag gct ctg ctg gac gag ccc tac ctg gac cgg ctg			1632
Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu			
530	535	540	
ccg ggg cag aag gag gcg cac gca cag gcc ggc gtg cag gtg aag cag			1680
Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln			
545	550	555	560
gag ccc att gag agc gat gag gaa gag gca gag ccc cca cgg gag gtg			1728
Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val			
565	570	575	
gag ccg ggc cag cgc cag ccc agt gag cag gag ctg ctc ttc aga cag			1776
Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln			
580	585	590	
caa gcc ctc ctg ctg gag cag cag cgg atc cac cag ctg agg aac tac			1824
Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr			
595	600	605	
cag gcg tcc atg gag gcc gcc ggc atc ccc gtg tcc ttc ggc ggc cac			1872
Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His			
610	615	620	
agg cct ctg tcc cgg gcg cag tcc tca ccc gcg tct gcc acc ttc ccc			1920
Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro			
625	630	635	640

6/123

gtg tct gtg cag gag ccc ccc acc aag ccg agg ttc acg aca ggc ctc Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu	1968
645 650 655	
gtg tat gac acg ctg atg ctg aag cac cag tgc acc tgc ggg agt agc Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser	2016
660 665 670	
agc agc cac ccc gag cac gcc ggg agg atc cag agc atc tgg tcc cgc Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg	2064
675 680 685	
ctg cag gag acg ggc ctc cgg ggc aaa tgc gag tgc atc cgc gga cgc Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg	2112
690 695 700	
aag gcc acc ctg gag gag cta cag acg gtg cac tcg gaa gcc cac acc Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr	2160
705 710 715 720	
ctc ctg tat ggc acg aac ccc ctc aac cgg cag aaa ctg gac agt aag Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys	2208
725 730 735	
aaa ctt cta ggc tcg ctc gcc tcc gtg ttc gtc cgg ctc cct tgc ggt Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly	2256
740 745 750	
ggt gtt ggg gtg gac agt gac acc ata tgg aac gag gtg cac tcg gcg Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala	2304
755 760 765	
ggg gca gcc cgc ctg gct gtg ggc tgc gtg gta gag ctg gtc ttc aag Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys	2352
770 775 780	

7/123

gtg gcc aca ggg gag ctg aag aat ggc ttt gct gtg gtc cgc ccc cct	2400
Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro	
785                                790                                795                                800	
 gga cac cat gcg gag gag agc acg ccc atg ggc ttt tgc tac ttc aac	2448
Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn	
805                                810                                815	
 tcc gtg gcc gtg gca gcc aag ctt ctg cag cag agg ttg agc gtg agc	2496
Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser	
820                                825                                830	
 aag atc ctc atc gtg gac tgg gac gtg cac cat gga aac ggg acc cag	2544
Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln	
835                                840                                845	
 cag gct ttc tac agc gac cct agc gtc ctg tac atg tcc ctc cac cgc	2592
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu His Arg	
850                                855                                860	
 tac gac gat ggg aac ttc ttc cca ggc agc ggg gct cct gat gag gtg	2640
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val	
865                                870                                875                                880	
 ggc aca ggg ccc ggc gtg ggt ttc aac gtc aac atg gct ttc acc ggc	2688
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly	
885                                890                                895	
 ggc ctg gac ccc ccc atg gga gac gct gag tac ttg gcg gcc ttc aga	2736
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg	
900                                905                                910	
 acg gtg gtc atg ccg atc gcc agc gag ttt gcc ccg gat gtg gtg ctg	2784
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu	
915                                920                                925	
 gtg tca tca ggc ttc gat gcc gtg gag ggc cac ccc acc cct ctt ggg	2832



8/123

Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly	
930 935 940	
ggc tac aac ctc tcc gcc aga tgc ttc ggg tac ctg acg aag cag ctg	2880
Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu	
945 950 955 960	
atg ggc ctg gct ggc ggc cgg att gtc ctg gcc ctc gag gga ggc cac	2928
Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His	
965 970 975	
gac ctg acc gcc att tgc gac gcc tcg gaa gca tgt gtt tct gcc ttg	2976
Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu	
980 985 990	
ctg gga aac gag ctt gat cct ctc cca gaa aag gtt tta cag caa aga	3024
Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg	
995 1000 1005	
ccc aat gca aac gct gtc cgt tcc atg gag aaa gtc atg gag atc cac	3072
Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His	
1010 1015 1020	
agc aag tac tgg cgc tgc ctg cag cgc aca acc tcc aca gcg ggg cgt	3120
Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg	
1025 1030 1035 1040	
tct ctg atc gag gct cag act tgc gag aac gaa gaa gcc gag acg gtc	3168
Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val	
1045 1050 1055	
acc gcc atg gcc tcg ctg tcc gtg ggc gtg aag ccc gcc gaa aag aga	3216
Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg	
1060 1065 1070	
cca gat gag gag ccc atg gaa gag gag ccg ccc ctg tag	3255
Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu	

9/123

1075

1080

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1084

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro  
1 5 10 15

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val  
20 25 30

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro  
35 40 45

Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro  
50 55 60

Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln  
65 70 75 80

Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln  
85 90 95

His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile  
100 105 110

Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu  
115 120 125

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu  
130 135 140

Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys

10/123

145	150	155	160
Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln			
	165	170	175
Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn			
	180	185	190
His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His			
	195	200	205
Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser			
	210	215	220
Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro			
	225	230	235
			240
Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu			
	245	250	255
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys			
	260	265	270
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr			
	275	280	285
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn			
	290	295	300
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val			
	305	310	315
			320
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg			
	325	330	335
Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro			
	340	345	350

11/123

Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala  
355 360 365

Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg  
370 375 380

Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser  
385 390 395 400

Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His  
405 410 415

Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly  
420 425 430

Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg  
435 440 445

Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg  
450 455 460

Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu  
465 470 475 480

Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln  
485 490 495

Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser  
500 505 510

Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu  
515 520 525

Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu  
530 535 540

12/123

Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln  
545                      550                      555                      560

Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val  
                    565                      570                      575

Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln  
                    580                      585                      590

Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr  
                    595                      600                      605

Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His  
                    610                      615                      620

Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro  
625                      630                      635                      640

Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu  
                    645                      650                      655

Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser  
                    660                      665                      670

Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg  
                    675                      680                      685

Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg  
                    690                      695                      700

Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr  
705                      710                      715                      720

Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys  
                    725                      730                      735

Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly

13/123

740	745	750
Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala		
755	760	765
Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys		
770	775	780
Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro		
785	790	795 800
Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn		
805	810	815
Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser		
820	825	830
Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln		
835	840	845
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu His Arg		
850	855	860
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val		
865	870	875 880
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly		
885	890	895
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg		
900	905	910
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu		
915	920	925
Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly		
930	935	940

14/123

Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu  
945 950 955 960

Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His  
965 970 975

Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu  
980 985 990

Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg  
995 1000 1005

Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His  
1010 1015 1020

Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg  
1025 1030 1035 1040

Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val  
1045 1050 1055

Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg  
1060 1065 1070

Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu  
1075 1080

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3255

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (3255)

15/123

<223> Dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 3

atg agc tcc caa agc cat cca gat gga ctt tct ggc cga gac cag cca	48
Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro	
1                      5                      10                      15	
gtg gag ctg ctg aat cct gcc cgc gtg aac cac atg ccc agc acg gtg	96
Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val	
20                      25                      30	
gat gtg gcc acg gcg ctg cct ctg caa gtg gcc ccc tcg gca gtg ccc	144
Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro	
35                      40                      45	
atg gac ctg cgc ctg gac cac cag ttc tca ctg cct gtg gca gag ccg	192
Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro	
50                      55                      60	
gcc ctg cgg gag cag cag ctg cag cag gag ctc ctg gcg ctc aag cag	240
Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln	
65                      70                      75                      80	
aag cag cag atc cag agg cag atc ctc atc gct gag ttc cag agg cag	288
Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln	
85                      90                      95	
cac gag cag ctc tcc cgg cag cac gag gcg cag ctc cac gag cac atc	336
His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile	
100                      105                      110	
aag caa caa cag gag atg ctg gcc atg aag cac cag cag gag ctg ctg	384
Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu	
115                      120                      125	
gaa cac cag cgg aag ctg gag agg cac cgc cag gag cag gag ctg gag	432



16/123

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu	
130	135 140
aag cag cac cgg gag cag aag ctg cag cag ctc aag aac aag gag aag	480
Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys	
145	150 155 160
ggc aaa gag agt gcc gtg gcc agc aca gaa gtg aag atg aag tta caa	528
Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln	
	165 170 175
gaa ttt gtc ctc aat aaa aag aag gcg ctg gcc cac cgg aat ctg aac	576
Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn	
	180 185 190
cac tgc att tcc agc gac cct cgc tac tgg tac ggg aaa acg cag cac	624
His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His	
	195 200 205
agt tcc ctt gac cag agt tct cca ccc cag agc gga gtg tcg acc tcc	672
Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser	
	210 215 220
tat aac cac ccg gtc ctg gga atg tac gac gcc aaa gat gac ttc cct	720
Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro	
	225 230 235 240
ctt agg aaa aca gct tct gaa ccg aat ctg aaa tta cgg tcc agg cta	768
Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu	
	245 250 255
aag cag aaa gtg gcc gaa aga ccg agc agc ccc ctg tta cgc agg aaa	816
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys	
	260 265 270
gac ggg cca gtg gtc act gct cta aaa aag cgt ccg ttg gat gtc aca	864
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr	

17/123

275	280	285	
gac tcc gcg tgc agc agc gcc cca ggc tcc gga ccc agc tca ccc aac .			912
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn			
290	295	300	
aac agc tcc ggg agc gtc agc gcg gag aac ggt atc gcg ccc gcc gtc			960
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val			
305	310	315	320
ccc agc atc ccg gcg gag acg agt ttg gcg cac aga ctt gtg gca cga			1008
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg			
325	330	335	
gaa ggc tcg gcc gct cca ctt ccc ctc tac aca tcg cca tcc ttg ccc			1056
Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro			
340	345	350	
aac atc acg ctg ggc ctg cct gcc acc ggc ccc tct gcg ggc acg gcg			1104
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala			
355	360	365	
ggc cag cag gac acc gag aga ctc acc ctt ccc gcc ctc cag cag agg			1152
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg			
370	375	380	
ctc tcc ctt ttc ccc ggc acc cac ctc act ccc tac ctg agc acc tcg			1200
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser			
385	390	395	400
ccc ttg gag cgg gac gga ggg gca gcg cac agc cct ctt ctg cag cac			1248
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His			
405	410	415	
atg gtc tta ctg gag cag cca ccg gca caa gca ccc ctc gtc aca ggc			1296
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly			
420	425	430	

18/123

ctg gga gca ctg ccc ctc cac gca cag tcc ttg gtt ggt gca gac cgg	1344
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg	
435 440 445	
gtg tcc ccc tcc atc cac aag ctg cgg cag cac cgc cca ctg ggg cgg	1392
Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg	
450 455 460	
acc cag tgc gcc ccg ctg ccc cag aac gcc cag gct ctg cag cac ctg	1440
Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu	
465 470 475 480	
gtc atc cag cag cag cat cag cag ttt ctg gag aaa cac aag cag cag	1488
Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln	
485 490 495	
ttc cag cag cag caa ctg cag atg aac aag atc atc ccc aag cca agc	1536
Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser	
500 505 510	
gag cca gcc cgg cag ccg gag agc cac ccg gag gag acg gag gag gag	1584
Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu	
515 520 525	
ctc cgt gag cac cag gct ctg ctg gac gag ccc tac ctg gac cgg ctg	1632
Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu	
530 535 540	
cgc ggg cag aag gag gcg cac gca cag gcc gcc gtg cag gtg aag cag	1680
Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln	
545 550 555 560	
gag ccc att gag agc gat gag gaa gag gca gag ccc cca cgg gag gtg	1728
Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val	
565 570 575	

19/123

gag ccg ggc cag cgc cag ccc agt gag cag gag ctg ctc ttc aga cag	1776
Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln	
580 585 590	
caa gcc ctc ctg ctg gag cag cag cgg atc cac cag ctg agg aac tac	1824
Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr	
595 600 605	
cag gcg tcc atg gag gcc gcc ggc atc ccc gtg tcc ttc ggc ggc cac	1872
Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His	
610 615 620	
agg cct ctg tcc cgg gcg cag tcc tca ccc gcg tct gcc acc ttc ccc	1920
Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro	
625 630 635 640	
gtg tct gtg cag gag ccc ccc acc aag ccg agg ttc acg aca ggc ctc	1968
Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu	
645 650 655	
gtg tat gac acg ctg atg ctg aag cac cag tgc acc tgc ggg agt agc	2016
Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser	
660 665 670	
agc agc cac ccc gag cac gcc ggg agg atc cag agc atc tgg tcc cgc	2064
Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg	
675 680 685	
ctg cag gag acg ggc ctc cgg ggc aaa tgc gag tgc atc cgc gga cgc	2112
Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg	
690 695 700	
aag gcc acc ctg gag gag cta cag acg gtg cac tcg gaa gcc cac acc	2160
Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr	
705 710 715 720	
ctc ctg tat ggc acg aac ccc ctc aac cgg cag aaa ctg gac agt aag	2208

20/123

Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys	
725 730 735	
aaa ctt cta ggc tcg ctc gcc tcc gtg ttc gtc cgg ctc cct tgc ggt	2256
Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly	
740 745 750	
ggt gtt ggg gtg gac agt gac acc ata tgg aac gag gtg cac tcg gcg	2304
Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala	
755 760 765	
ggg gca gcc cgc ctg gct gtg ggc tgc gtg gta gag ctg gtc ttc aag	2352
Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys	
770 775 780	
gtg gcc aca ggg gag ctg aag aat ggc ttt gct gtg gtc cgc ccc cct	2400
Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro	
785 790 795 800	
gga aag ctt gcg gag gag agc acg ccc atg ggc ttt tgc tac ttc aac	2448
Gly Lys Leu Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn	
805 810 815	
tcc gtg gcc gtg gca gcc aag ctt ctg cag cag agg ttg agc gtg agc	2496
Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser	
820 825 830	
aag atc ctc atc gtg gac tgg gac gtg cac cat gga aac ggg acc cag	2544
Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln	
835 840 845	
cag gct ttc tac agc gac cct agc gtc ctg tac atg tcc ctc cac cgc	2592
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu His Arg	
850 855 860	
tac gac gat ggg aac ttc ttc cca ggc agc ggg gct cct gat gag gtg	2640
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val	

21/123

865	870	875	880	
ggc aca ggg ccc ggc gtg ggt ttc aac gtc aac atg gct ttc acc ggc				2688
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly				
	885	890	895	
ggc ctg gac ccc ccc atg gga gac gct gag tac ttg gcg gcc ttc aga				2736
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg				
	900	905	910	
acg gtg gtc atg ccg atc gcc agc gag ttt gcc ccg gat gtg gtg ctg				2784
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu				
	915	920	925	
gtg tca tca ggc ttc gat gcc gtg gag ggc cac ccc acc cct ctt ggg				2832
Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly				
	930	935	940	
ggc tac aac ctc tcc gcc aga tgc ttc ggg tac ctg acg aag cag ctg				2880
Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu				
	945	950	955	960
atg ggc ctg gct ggc ggc cgg att gtc ctg gcc ctc gag gga ggc cac				2928
Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His				
	965	970	975	
gac ctg acc gcc att tgc gac gcc tcg gaa gca tgt gtt tct gcc ttg				2976
Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu				
	980	985	990	
ctg gga aac gag ctt gat cct ctc cca gaa aag gtt tta cag caa aga				3024
Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg				
	995	1000	1005	
ccc aat gca aac gct gtc cgt tcc atg gag aaa gtc atg gag atc cac				3072
Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His				
	1010	1015	1020	

22/123

agc aag tac tgg cgc tgc ctg cag cgc aca acc tcc aca gcg tct ctg 3120  
 Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg  
 1025 1030 1035 1040

tct ctg atc gag gct cag act tgc gag aac gaa gaa gcc gag acg gtc 3168  
 Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val  
 1045 1050 1055

acc gcc atg gcc tcg ctg tcc gtg ggc gtg aag ccc gcc gaa aag aga 3216  
 Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg  
 1060 1065 1070

cca gat gag gag ccc atg gaa gag gag ccg ccc ctg tag 3255  
 Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu  
 1075 1080

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1084

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4  
 (HDAC4) gene

&lt;400&gt; 4

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro  
 1 5 10 15

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val  
 20 25 30

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro  
 35 40 45

23/123

Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro  
50 55 60

Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln  
65 70 75 80

Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln  
85 90 95

His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile  
100 105 110

Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu  
115 120 125

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu  
130 135 140

Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys  
145 150 155 160

Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln  
165 170 175

Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn  
180 185 190

His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His  
195 200 205

Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser  
210 215 220

Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro  
225 230 235 240

Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu



24/123

245	250	255
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys		
260	265	270
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr		
275	280	285
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn		
290	295	300
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val		
305	310	315
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg		
325	330	335
Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro		
340	345	350
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala		
355	360	365
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg		
370	375	380
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser		
385	390	395
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His		
405	410	415
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly		
420	425	430
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg		
435	440	445

25/123

Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg  
450 455 460

Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu  
465 470 475 480

Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln  
485 490 495

Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser  
500 505 510

Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu  
515 520 525

Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu  
530 535 540

Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Lys Gln  
545 550 555 560

Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu Pro Pro Arg Glu Val  
565 570 575

Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu Leu Leu Phe Arg Gln  
580 585 590

Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His Gln Leu Arg Asn Tyr  
595 600 605

Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val Ser Phe Gly Gly His  
610 615 620

Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ser Ala Thr Phe Pro  
625 630 635 640

26/123

Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg Phe Thr Thr Gly Leu  
645 650 655

Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser  
660 665 670

Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg  
675 680 685

Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg  
690 695 700

Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr  
705 710 715 720

Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys  
725 730 735

Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly  
740 745 750

Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala  
755 760 765

Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys  
770 775 780

Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro  
785 790 795 800

Gly Lys Leu Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn  
805 810 815

Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser  
820 825 830

Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln

27/123

835	840	845
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu His Arg		
850	855	860
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val		
865	870	875 880
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly		
885	890	895
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg		
900	905	910
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu		
915	920	925
Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly		
930	935	940
Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Gln Leu		
945	950	955 960
Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly His		
965	970	975
Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ser Ala Leu		
980	985	990
Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Leu Gln Gln Arg		
995	1000	1005
Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys Val Met Glu Ile His		
1010	1015	1020
Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr Ser Thr Ala Gly Arg		
1025	1030	1035 1040

28/123

Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu Glu Ala Glu Thr Val  
 1045 1050 1055

Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys Pro Ala Glu Lys Arg  
 1060 1065 1070

Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro Leu  
 1075 1080

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 3255

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (3255)

<223> Dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4)  
 gene

&lt;400&gt; 5

atg agc tcc caa agc cat cca gat gga ctt tct ggc cga gac cag cca 48  
 Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro  
 1 5 10 15

gtg gag ctg ctg aat cct gcc cgc gtg aac cac atg ccc agc acg gtg 96  
 Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val  
 20 25 30

gat gtg gcc acg gcg ctg cct ctg caa gtg gcc ccc tcg gca gtg ccc 144  
 Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro  
 35 40 45

atg gac ctg cgc ctg gac cac cag ttc tca ctg cct gtg gca gag ccg 192  
 Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro

29/123

50	55	60	
gcc ctg cgg gag cag cag ctg cag cag gag ctc ctg gcg ctc aag cag			240
Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln			
65	70	75	80
aag cag cag atc cag agg cag atc ctc atc gct gag ttc cag agg cag			288
Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln			
	85	90	95
cac gag cag ctc tcc cgg cag cac gag gcg cag ctc cac gag cac atc			336
His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile			
	100	105	110
aag caa caa cag gag atg ctg gcc atg aag cac cag cag gag ctg ctg			384
Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu			
	115	120	125
gaa cac cag cgg aag ctg gag agg cac cgc cag gag cag gag ctg gag			432
Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu			
	130	135	140
aag cag cac cgg gag cag aag ctg cag cag ctc aag aac aag gag aag			480
Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu Lys Asn Lys Glu Lys			
145	150	155	160
ggc aaa gag agt gcc gtg gcc agc aca gaa gtg aag atg aag tta caa			528
Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val Lys Met Lys Leu Gln			
	165	170	175
gaa ttt gtc ctc aat aaa aag aag gcg ctg gcc cac cgg aat ctg aac			576
Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Leu Asn			
	180	185	190
cac tgc att tcc agc gac cct cgc tac tgg tac ggg aaa acg cag cac			624
His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr Gly Lys Thr Gln His			
	195	200	205

30/123

agc tcc ctt gac cag agt tct cca ccc cag agc gga gtg tcg acc tcc	672
Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser Gly Val Ser Thr Ser	
210 215 220	
tat aac cac ccg gtc ctg gga atg tac gac gcc aaa gat gac ttc cct	720
Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala Lys Asp Asp Phe Pro	
225 230 235 240	
ctt agg aaa aca gct tct gaa ccg aat ctg aaa tta cgg tcc agg cta	768
Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys Leu Arg Ser Arg Leu	
245 250 255	
aag cag aaa gtg gcc gaa aga cgg agc agc ccc ctg tta cgc agg aaa	816
Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Arg Lys	
260 265 270	
gac ggg cca gtg gtc act gct cta aaa aag cgt ccg ttg gat gtc aca	864
Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg Pro Leu Asp Val Thr	
275 280 285	
gac tcc gcg tgc agc agc gcc cca ggc tcc gga ccc agc tca ccc aac	912
Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly Pro Ser Ser Pro Asn	
290 295 300	
aac agc tcc ggg agc gtc agc gcg gag aac ggt atc gcg ccc gcc gtc	960
Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly Ile Ala Pro Ala Val	
305 310 315 320	
ccc agc atc ccg gcg gag acg agt ttg gcg cac aga ctt gtg gca cga	1008
Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His Arg Leu Val Ala Arg	
325 330 335	
gaa ggc tcg gcc gct cca ctt ccc ctc tac aca tcg cca tcc ttg ccc	1056
Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Ser Leu Pro	
340 345 350	

31/123

aac atc acg ctg ggc ctg cct gcc acc ggc ccc tct gcg ggc acg gcg Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala 355 360 365	1104
ggc cag cag gac acc gag aga ctc acc ctt ccc gcc ctc cag cag agg Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg 370 375 380	1152
ctc tcc ctt ttc ccc ggc acc cac ctc act ccc tac ctg agc acc tcg Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser 385 390 395 400	1200
ccc ttg gag cgg gac gga ggg gca gcg cac agc cct ctt ctg cag cac Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His 405 410 415	1248
atg gtc tta ctg gag cag cca ccg gca caa gca ccc ctc gtc aca ggc Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly 420 425 430	1296
ctg gga gca ctg ccc ctc cac gca cag tcc ttg gtt ggt gca gac cgg Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg 435 440 445	1344
gtg tcc ccc tcc atc cac aag ctg cgg cag cac cgc cca ctg ggg cgg Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg 450 455 460	1392
acc cag tcg gcc ccg ctg ccc cag aac gcc cag gct ctg cag cac ctg Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu 465 470 475 480	1440
gtc atc cag cag cag cat cag cag ttt ctg gag aaa cac aag cag cag Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln 485 490 495	1488
ttc cag cag cag caa ctg cag atg aac aag atc atc ccc aag cca agc	1536



32/123

Phe	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Met	Asn	Lys	Ile	Ile	Pro	Lys	Pro	Ser		
500						505						510					
gag	cca	gcc	cgg	cag	ccg	gag	agc	cac	ccg	gag	gag	acg	gag	gag	gag	1584	
Glu	Pro	Ala	Arg	Gln	Pro	Glu	Ser	His	Pro	Glu	Glu	Thr	Glu	Glu	Glu		
515						520						525					
ctc	cgt	gag	cac	cag	gct	ctg	ctg	gac	gag	ccc	tac	ctg	gac	cgg	ctg	1632	
Leu	Arg	Glu	His	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Arg	Leu		
530						535						540					
ccg	ggg	cag	aag	gag	gcg	cac	gca	cag	gcc	ggc	gtg	cag	gtg	aag	cag	1680	
Pro	Gly	Gln	Lys	Glu	Ala	His	Ala	Gln	Ala	Gly	Val	Gln	Val	Lys	Gln		
545						550						555			560		
gag	ccc	att	gag	agc	gat	gag	gaa	gag	gca	gag	ccc	cca	cgg	gag	gtg	1728	
Glu	Pro	Ile	Glu	Ser	Asp	Glu	Glu	Glu	Ala	Glu	Pro	Pro	Arg	Glu	Val		
			565						570						575		
gag	ccg	ggc	cag	cgc	cag	ccc	agt	gag	cag	gag	ctg	ctc	ttc	aga	cag	1776	
Glu	Pro	Gly	Gln	Arg	Gln	Pro	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Phe	Arg	Gln		
			580						585						590		
caa	gcc	ctc	ctg	ctg	gag	cag	cag	cgg	atc	cac	cag	ctg	agg	aac	tac	1824	
Gln	Ala	Leu	Leu	Leu	Glu	Gln	Gln	Arg	Ile	His	Gln	Leu	Arg	Asn	Tyr		
595						600						605					
cag	gcg	tcc	atg	gag	gcc	gcc	ggc	atc	ccc	gtg	tcc	ttc	ggc	ggc	cac	1872	
Gln	Ala	Ser	Met	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Phe	Gly	Gly	His		
610						615						620					
agg	cct	ctg	tcc	cgg	gcg	cag	tcc	tca	ccc	gcg	tct	gcc	acc	ttc	ccc	1920	
Arg	Pro	Leu	Ser	Arg	Ala	Gln	Ser	Ser	Pro	Ala	Ser	Ala	Thr	Phe	Pro		
625						630						635			640		
gtg	tct	gtg	cag	gag	ccc	ccc	acc	aag	ccg	agg	ttc	acg	aca	ggc	ctc	1968	
Val	Ser	Val	Gln	Glu	Pro	Pro	Thr	Lys	Pro	Arg	Phe	Thr	Thr	Gly	Leu		

33/123

645	650	655	
gtg tat gac acg ctg atg ctg aag cac cag tgc acc tgc ggg agt agc			2016
Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys Thr Cys Gly Ser Ser			
660	665	670	
agc agc cac ccc gag cac gcc ggg agg atc cag agc atc tgg tcc cgc			2064
Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg			
675	680	685	
ctg cag gag acg ggc ctc cgg ggc aaa tgc gag tgc atc cgc gga cgc			2112
Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu Cys Ile Arg Gly Arg			
690	695	700	
aag gcc acc ctg gag gag cta cag acg gtg cac tcg gaa gcc cac acc			2160
Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His Ser Glu Ala His Thr			
705	710	715	720
ctc ctg tat ggc acg aac ccc ctc aac cgg cag aaa ctg gac agt aag			2208
Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys			
725	730	735	
aaa ctt cta ggc tcg ctc gcc tcc gtg ttc gtc cgg ctc cct tgc ggt			2256
Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly			
740	745	750	
ggt gtt ggg gtg gac agt gac acc ata tgg aac gag gtg cac tcg gcg			2304
Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala			
755	760	765	
ggg gca gcc cgc ctg gct gtg ggc tgc gtg gta gag ctg gtc ttc aag			2352
Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys			
770	775	780	
gtg gcc aca ggg gag ctg aag aat ggc ttt gct gtg gtc cgc ccc cct			2400
Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro			
785	790	795	800

gga cac cat gcg gag gag agc acg ccc atg ggc ttt tgc tac ttc aac	2448
Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn	
805 810 815	
tcc gtg gcc gtg gca gcc aag ctt ctg cag cag agg ttg agc gtg agc	2496
Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser	
820 825 830	
aag atc ctc atc gtg gac tgg gac gtg cac cat gga aac ggg acc cag	2544
Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln	
835 840 845	
cag gct ttc tac agc gac cct agc gtc ctg tac atg tcc ctc ctt cgc	2592
Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu Leu Arg	
850 855 860	
tac gac gat ggg aac ttc ttc cca ggc agc ggg gct cct gat gag gtg	2640
Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val	
865 870 875 880	
ggc aca ggg ccc ggc gtg ggt ttc aac gtc aac atg gct ttc acc ggc	2688
Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly	
885 890 895	
ggc ctg gac ccc ccc atg gga gac gct gag tac ttg gcg gcc ttc aga	2736
Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg	
900 905 910	
acg gtg gtc atg ccg atc gcc agc gag ttt gcc ccg gat gtg gtg ctg	2784
Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu	
915 920 925	
gtg tca tca ggc ttc gat gcc gtg gag ggc cac ccc acc cct ctt ggg	2832
Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly	
930 935 940	



&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1084

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

&lt;400&gt; 6

Met Ser Ser Gln Ser His Pro Asp Gly Leu Ser Gly Arg Asp Gln Pro  
1 5 10 15

Val Glu Leu Leu Asn Pro Ala Arg Val Asn His Met Pro Ser Thr Val  
20 25 30

Asp Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Gln Val Ala Pro Ser Ala Val Pro  
35 40 45

Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu Pro Val Ala Glu Pro  
50 55 60

Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Leu Ala Leu Lys Gln  
65 70 75 80

Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala Glu Phe Gln Arg Gln  
85 90 95

His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln Leu His Glu His Ile  
100 105 110

Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His Gln Gln Glu Leu Leu  
115 120 125

Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln Glu Gln Glu Leu Glu  
130 135 140

Lys	Gln	His	Arg	Glu	Gln	Lys	Leu	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Lys	Glu	Lys
145						150					155				160
Gly	Lys	Glu	Ser	Ala	Val	Ala	Ser	Thr	Glu	Val	Lys	Met	Lys	Leu	Gln
				165					170					175	
Glu	Phe	Val	Leu	Asn	Lys	Lys	Lys	Ala	Leu	Ala	His	Arg	Asn	Leu	Asn
			180					185					190		
His	Cys	Ile	Ser	Ser	Asp	Pro	Arg	Tyr	Trp	Tyr	Gly	Lys	Thr	Gln	His
		195					200					205			
Ser	Ser	Leu	Asp	Gln	Ser	Ser	Pro	Pro	Gln	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Ser
	210						215				220				
Tyr	Asn	His	Pro	Val	Leu	Gly	Met	Tyr	Asp	Ala	Lys	Asp	Asp	Phe	Pro
225					230					235					240
Leu	Arg	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Pro	Asn	Leu	Lys	Leu	Arg	Ser	Arg	Leu
				245					250					255	
Lys	Gln	Lys	Val	Ala	Glu	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Arg	Arg	Lys
			260					265					270		
Asp	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Lys	Arg	Pro	Leu	Asp	Val	Thr
		275					280					285			
Asp	Ser	Ala	Cys	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn
	290					295					300				
Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Ala	Glu	Asn	Gly	Ile	Ala	Pro	Ala	Val
305					310					315					320
Pro	Ser	Ile	Pro	Ala	Glu	Thr	Ser	Leu	Ala	His	Arg	Leu	Val	Ala	Arg
				325					330					335	
Glu	Gly	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Pro	Leu	Tyr	Thr	Ser	Pro	Ser	Leu	Pro

38/123

340	345	350
Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro Ser Ala Gly Thr Ala		
355	360	365
Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro Ala Leu Gln Gln Arg		
370	375	380
Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro Tyr Leu Ser Thr Ser		
385	390	395 400
Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser Pro Leu Leu Gln His		
405	410	415
Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala Pro Leu Val Thr Gly		
420	425	430
Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu Val Gly Ala Asp Arg		
435	440	445
Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His Arg Pro Leu Gly Arg		
450	455	460
Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln Ala Leu Gln His Leu		
465	470	475 480
Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu Lys His Lys Gln Gln		
485	490	495
Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile Ile Pro Lys Pro Ser		
500	505	510
Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu Glu Thr Glu Glu Glu		
515	520	525
Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Asp Arg Leu		
530	535	540

Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln Lys Leu Asp Ser Lys  
725 730 735



40/123

Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val Arg Leu Pro Cys Gly  
740 745 750

Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn Glu Val His Ser Ala  
755 760 765

Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val Glu Leu Val Phe Lys  
770 775 780

Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro  
785 790 795 800

Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly Phe Cys Tyr Phe Asn  
805 810 815

Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln Arg Leu Ser Val Ser  
820 825 830

Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr Gln  
835 840 845

Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr Met Ser Leu Leu Arg  
850 855 860

Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Pro Asp Glu Val  
865 870 875 880

Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn Met Ala Phe Thr Gly  
885 890 895

Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg  
900 905 910

Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala Pro Asp Val Val Leu  
915 920 925

Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His Pro Thr Pro Leu Gly

<210>	7
<211>	1743
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

<220>  
<221> CDS

42/123

&lt;222&gt; (43)..(1176)

&lt;223&gt; human histone deacetylase-8 (HDAC8) gene

&lt;400&gt; 7

gccagatctg gaaggtggt gcggaacggt ttttaagcgga ag atg gag gag ccg 54  
 Met Glu Glu Pro  
 1

gag gaa ccg gcg gac agt ggg cag tcg ctg gtc ccg gtt tat atc tat 102  
 Glu Glu Pro Ala Asp Ser Gly Gln Ser Leu Val Pro Val Tyr Ile Tyr  
 5 10 15 20

agt ccc gag tat gtc agt atg tgt gac tcc ctg gcc aag atc ccc aaa 150  
 Ser Pro Glu Tyr Val Ser Met Cys Asp Ser Leu Ala Lys Ile Pro Lys  
 25 30 35

cgg gcc agt atg gtg cat tct ttg att gaa gca tat gca ctg cat aag 198  
 Arg Ala Ser Met Val His Ser Leu Ile Glu Ala Tyr Ala Leu His Lys  
 40 45 50

cag atg agg ata gtt aag cct aaa gtg gcc tcc atg gag gag atg gcc 246  
 Gln Met Arg Ile Val Lys Pro Lys Val Ala Ser Met Glu Glu Met Ala  
 55 60 65

acc ttc cac act gat gct tat ctg cag cat ctc cag aag gtc agc caa 294  
 Thr Phe His Thr Asp Ala Tyr Leu Gln His Leu Gln Lys Val Ser Gln  
 70 75 80

gag ggc gat gat gat cat ccg gac tcc ata gaa tat ggg cta ggt tat 342  
 Glu Gly Asp Asp Asp His Pro Asp Ser Ile Glu Tyr Gly Leu Gly Tyr  
 85 90 95 100

gac tgc cca gcc act gaa ggg ata ttt gac tat gca gca gct ata gga 390  
 Asp Cys Pro Ala Thr Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Ala Ala Ala Ile Gly  
 105 110 115

ggg gct acg atc aca gct gcc caa tgc ctg att gac gga atg tgc aaa 438

43/123

Gly Ala Thr Ile Thr Ala Ala Gln Cys Leu Ile Asp Gly Met Cys Lys	
120 125 130	
gta gca att aac tgg tct gga ggg tgg cat cat gca aag aaa gat gaa	486
Val Ala Ile Asn Trp Ser Gly Gly Trp His His Ala Lys Lys Asp Glu	
135 140 145	
gca tct ggt ttt tgt tat ctc aat gat gct gtc ctg gga ata tta cga	534
Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Leu Asn Asp Ala Val Leu Gly Ile Leu Arg	
150 155 160	
ttg cga cgg aaa ttt gag cgt att ctc tac gtg gat ttg gat ctg cac	582
Leu Arg Arg Lys Phe Glu Arg Ile Leu Tyr Val Asp Leu Asp Leu His	
165 170 175 180	
cat gga gat ggt gta gaa gac gca ttc agt ttc acc tcc aaa gtc atg	630
His Gly Asp Gly Val Glu Asp Ala Phe Ser Phe Thr Ser Lys Val Met	
185 190 195	
acc gtg tcc ctg cac aaa ttc tcc cca gga ttt ttc cca gga aca ggt	678
Thr Val Ser Leu His Lys Phe Ser Pro Gly Phe Phe Pro Gly Thr Gly	
200 205 210	
gac gtg tct gat gtt ggc cta ggg aag gga cgg tac tac agt gta aat	726
Asp Val Ser Asp Val Gly Leu Gly Lys Gly Arg Tyr Tyr Ser Val Asn	
215 220 225	
gtg ccc att cag gat ggc ata caa gat gaa aaa tat tac cag atc tgt	774
Val Pro Ile Gln Asp Gly Ile Gln Asp Glu Lys Tyr Tyr Gln Ile Cys	
230 235 240	
gaa agt gta cta aag gaa gta tac caa gcc ttt aat ccc aaa gca gtg	822
Glu Ser Val Leu Lys Glu Val Tyr Gln Ala Phe Asn Pro Lys Ala Val	
245 250 255 260	
gtc tta cag ctg gga gct gac aca ata gct ggg gat ccc atg tgc tcc	870
Val Leu Gln Leu Gly Ala Asp Thr Ile Ala Gly Asp Pro Met Cys Ser	

44/123

265	270	275	
ttt aac atg act cca gtg gga att ggc aag tgt ctt aag tac atc ctt			918
Phe Asn Met Thr Pro Val Gly Ile Gly Lys Cys Leu Lys Tyr Ile Leu			
280	285	290	
caa tgg cag ttg gca aca ctc att ttg gga gga gga ggc tat aac ctt			966
Gln Trp Gln Leu Ala Thr Leu Ile Leu Gly Gly Gly Tyr Asn Leu			
295	300	305	
gcc aac acg gct cga tgc tgg aca tac ttg acc ggg gtc atc cta ggg			1014
Ala Asn Thr Ala Arg Cys Trp Thr Tyr Leu Thr Gly Val Ile Leu Gly			
310	315	320	
aaa aca cta tcc tct gag atc cca gat cat gag ttt ttc aca gca tat			1062
Lys Thr Leu Ser Ser Glu Ile Pro Asp His Glu Phe Phe Thr Ala Tyr			
325	330	335	340
ggt cct gat tat gtg ctg gaa atc acg cca agc tgc cgg cca gac cgc			1110
Gly Pro Asp Tyr Val Leu Glu Ile Thr Pro Ser Cys Arg Pro Asp Arg			
345	350	355	
aat gag ccc cac cga atc caa caa atc ctc aac tac atc aaa ggg aat			1158
Asn Glu Pro His Arg Ile Gln Gln Ile Leu Asn Tyr Ile Lys Gly Asn			
360	365	370	
ctg aag cat gtg gtc tag ttgacagaaa gagatcaggt ttccagagct			1206
Leu Lys His Val Val			
375			
gaggagtggg gcctataatg aagacagcgt gtttatgcaa gcagtttgtg gaatttgtga			1266
ctgcagggaa aatttgaaag aaattacttc ctgaaaattt ccaaggggca tcaagtggca			1326
gctggcttcc tggggtgaag aggcaggcac cccagagtcc tcaactggac ctaggggaag			1386
aaggagatat cccacattta aagttcttat ttaaaaaaac acacacacac aaatgaaatt			1446

tttaatcttt gaaaattatt ttttaagcgaa ttggggaggg gagtatttta atcatcttaa 1506  
 atgaaacaga tcagaagctg gatgagagca gtcaccagtt tgtagggcag gaggcagctg 1566  
 agaggcaggg ttgggcctc aggaccatcc aggtggagcc ctgggagaga gggtactgat 1626  
 cagcagactg ggaggtgggg agaagtccgc tgggtgttgtt ttagtgttat atatctttgg 1686  
 tttttttaat aaaatctttg aaacctaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1743

<210> 8

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Glu Pro Glu Glu Pro Ala Asp Ser Gly Gln Ser Leu Val Pro  
 1 5 10 15

Val Tyr Ile Tyr Ser Pro Glu Tyr Val Ser Met Cys Asp Ser Leu Ala  
 20 25 30

Lys Ile Pro Lys Arg Ala Ser Met Val His Ser Leu Ile Glu Ala Tyr  
 35 40 45

Ala Leu His Lys Gln Met Arg Ile Val Lys Pro Lys Val Ala Ser Met  
 50 55 60

Glu Glu Met Ala Thr Phe His Thr Asp Ala Tyr Leu Gln His Leu Gln  
 65 70 75 80

46/123

Lys Val Ser Gln Glu Gly Asp Asp Asp His Pro Asp Ser Ile Glu Tyr  
85 90 95

Gly Leu Gly Tyr Asp Cys Pro Ala Thr Glu Gly Ile Phe Asp Tyr Ala  
100 105 110

Ala Ala Ile Gly Gly Ala Thr Ile Thr Ala Ala Gln Cys Leu Ile Asp  
115 120 125

Gly Met Cys Lys Val Ala Ile Asn Trp Ser Gly Gly Trp His His Ala  
130 135 140

Lys Lys Asp Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Leu Asn Asp Ala Val Leu  
145 150 155 160

Gly Ile Leu Arg Leu Arg Arg Lys Phe Glu Arg Ile Leu Tyr Val Asp  
165 170 175

Leu Asp Leu His His Gly Asp Gly Val Glu Asp Ala Phe Ser Phe Thr  
180 185 190

Ser Lys Val Met Thr Val Ser Leu His Lys Phe Ser Pro Gly Phe Phe  
195 200 205

Pro Gly Thr Gly Asp Val Ser Asp Val Gly Leu Gly Lys Gly Arg Tyr  
210 215 220

47/123

Tyr Ser Val Asn Val Pro Ile Gln Asp Gly Ile Gln Asp Glu Lys Tyr  
225                      230                      235                      240

Tyr Gln Ile Cys Glu Ser Val Leu Lys Glu Val Tyr Gln Ala Phe Asn  
                    245                      250                      255

Pro Lys Ala Val Val Leu Gln Leu Gly Ala Asp Thr Ile Ala Gly Asp  
                    260                      265                      270

Pro Met Cys Ser Phe Asn Met Thr Pro Val Gly Ile Gly Lys Cys Leu  
                    275                      280                      285

Lys Tyr Ile Leu Gln Trp Gln Leu Ala Thr Leu Ile Leu Gly Gly Gly  
                    290                      295                      300

Gly Tyr Asn Leu Ala Asn Thr Ala Arg Cys Trp Thr Tyr Leu Thr Gly  
305                      310                      315                      320

Val Ile Leu Gly Lys Thr Leu Ser Ser Glu Ile Pro Asp His Glu Phe  
                    325                      330                      335

Phe Thr Ala Tyr Gly Pro Asp Tyr Val Leu Glu Ile Thr Pro Ser Cys  
                    340                      345                      350

Arg Pro Asp Arg Asn Glu Pro His Arg Ile Gln Gln Ile Leu Asn Tyr  
                    355                      360                      365

Ile Lys Gly Asn Leu Lys His Val Val



48/123

<210> 9  
 <211> 1449  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1449)  
 <223> human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 9  
 atg gcg cag acg cag ggc acc cgg agg aaa gtc tgt tac tac tac gac 48  
 Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp  
 1 5 10 15  
 ggg gat gtt gga aat tac tat tat gga caa ggc cac cca atg aag cct 96  
 Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro  
 20 25 30  
 cac cga atc cgc atg act cat aat ttg ctg ctc aac tat ggt ctc tac 144  
 His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr  
 35 40 45  
 cga aaa atg gaa atc tat cgc cct cac aaa gcc aat gct gag gag atg 192  
 Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met  
 50 55 60  
 acc aag tac cac agc gat gac tac att aaa ttc ttg cgc tcc atc cgt 240  
 Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg  
 65 70 75 80  
 cca gat aac atg tcg gag tac agc aag cag atg cag aga ttc aac gtt 288  
 Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val  
 85 90 95

ggt gag gac tgt cca gta ttc gat ggc ctg ttt gag ttc tgt cag ttg	336
Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu	
100 105 110	
tct act ggt ggt tct gtg gca agt gct gtg aaa ctt aat aag cag cag	384
Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln	
115 120 125	
acg gac atc gct gtg aat tgg gct ggg ggc ctg cac cat gca aag aag	432
Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys	
130 135 140	
tcc gag gca tct ggc ttc tgt tac gtc aat gat atc gtc ttg gcc atc	480
Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile	
145 150 155 160	
ctg gaa ctg cta aag tat cac cag agg gtg ctg tac att gac att gat	528
Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp	
165 170 175	
att cac cat ggt gac ggc gtg gaa gag gcc ttc tac acc acg gac cgg	576
Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg	
180 185 190	
gtc atg act gtg tcc ttt cat aag tat gga gag tac ttc cca gga act	624
Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr	
195 200 205	
ggg gac cta cgg gat atc ggg gct ggc aaa ggc aag tat tat gct gtt	672
Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val	
210 215 220	
aac tac ccg ctc cga gac ggg att gat gac gag tcc tat gag gcc att	720
Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile	
225 230 235 240	

50/123

ttc aag ccg gtc atg tcc aaa gta atg gag atg ttc cag cct agt gcg	768
Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala	
245 250 255	
gtg gtc tta cag tgt ggc tca gac tcc cta tct ggg gat cgg tta ggt	816
Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly	
260 265 270	
tgc ttc aat cta act atc aaa gga cac gcc aag tgt gtg gaa ttt gtc	864
Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val	
275 280 285	
aag agc ttt aac ctg cct atg ctg atg ctg gga ggc ggt ggt tac acc	912
Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr	
290 295 300	
att cgt aac gtt gcc cgg tgc agg aca tat gag aca gct gtg gcc ctg	960
Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu	
305 310 315 320	
gat acg gag atc cct aat gag ctt cca tac aat gac tac ttt gaa tac	1008
Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr	
325 330 335	
ttt gga cca gat ttc aag ctc cac atc agt cct tcc aat atg act aac	1056
Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn	
340 345 350	
cag aac acg aat gag tac ctg gag aag atc aaa cag cga ctg ttt gag	1104
Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu	
355 360 365	
aac ctt aga atg ctg ccg cac gca cct ggg gtc caa atg cag gcg att	1152
Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile	
370 375 380	
cct gag gac gcc atc cct gag gag agt ggc gat gag gac gaa gac gac	1200

Pro Glu Asp Ala Ile	Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp	
385	390	395 400
cct gac aag cgc atc tcg atc tgc tcc tct gac aaa cga att gcc tgt		1248
Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys		
405	410	415
gag gaa gag ttc tcc gat tct gaa gag gag gga gag ggg ggc cgc aag		1296
Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys		
420	425	430
aac tct tcc aac ttc aaa aaa gcc aag aga gtc aaa aca gag gat gaa		1344
Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu		
435	440	445
aaa gag aaa gac cca gag gag aag aaa gaa gtc acc gaa gag gag aaa		1392
Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys		
450	455	460
acc aag gag gag aag cca gaa gcc aaa ggg gtc aag gag gag gtc aag		1440
Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys		
465	470	480
ttg gcc tga		1449
Leu Ala		

<210>	10
<211>	482
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 10  
Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp  
1 5 10 15

52/123

Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro  
20 25 30

His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr  
35 40 45

Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met  
50 55 60

Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val  
85 90 95

Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu  
100 105 110

Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln  
115 120 125

Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys  
130 135 140

Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile  
145 150 155 160

53/123

Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp  
165 170 175

Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg  
180 185 190

Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr  
195 200 205

Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val  
210 215 220

Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile  
225 230 235 240

Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala  
245 250 255

Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly  
260 265 270

Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val  
275 280 285

Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr  
290 295 300

Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu

54/123

305

310

315

320

Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr  
325 330 335

Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn  
340 345 350

Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu  
355 360 365

Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile  
370 375 380

Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp  
385 390 395 400

Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys  
405 410 415

Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys  
420 425 430

Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu  
435 440 445

Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys  
450 455 460

Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys  
 465 470 475 480

Leu Ala

<210> 11

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1449)

<223> Dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 11

atg gcg cag acg cag ggc acc cgg agg aaa gtc tgt tac tac tac gac 48  
 Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp  
 1 5 10 15

ggg gat gtt gga aat tac tat tat gga caa ggc cac cca atg aag cct 96  
 Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro  
 20 25 30

cac cga atc cgc atg act cat aat ttg ctg ctc aac tat ggt ctc tac 144  
 His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr  
 35 40 45

cga aaa atg gaa atc tat cgc cct cac aaa gcc aat gct gag gag atg 192  
 Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met  
 50 55 60



56/123

acc aag tac cac agc gat gac tac att aaa ttc ttg cgc tcc atc cgt	240
Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg	
65 70 75 80	
cca gat aac atg tcg gag tac agc aag cag atg cag aga ttc aac gtt	288
Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val	
85 90 95	
ggt gag gac tgt cca gta ttc gat ggc ctg ttt gag ttc tgt cag ttg	336
Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu	
100 105 110	
tct act ggt ggt tct gtg gca agt gct gtg aaa ctt aat aag cag cag	384
Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln	
115 120 125	
acg gac atc gct gtg aat tgg gct ggg ggc ctg aag ctt gca aag aag	432
Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu Lys Leu Ala Lys Lys	
130 135 140	
tcc gag gca tct ggc ttc tgt tac gtc aat gat atc gtc ttg gcc atc	480
Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile	
145 150 155 160	
ctg gaa ctg cta aag tat cac cag agg gtg ctg tac att gac att gat	528
Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp	
165 170 175	
att cac cat ggt gac ggc gtg gaa gag gcc ttc tac acc acg gac cgg	576
Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg	
180 185 190	
gtc atg act gtg tcc ttt cat aag tat gga gag tac ttc cca gga act	624
Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr	
195 200 205	

57/123

ggg gac cta cgg gat atc ggg gct ggc aaa ggc aag tat tat gct gtt Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val 210 215 220	672
aac tac ccg ctc cga gac ggg att gat gac gag tcc tat gag gcc att Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile 225 230 235 240	720
ttc aag ccg gtc atg tcc aaa gta atg gag atg ttc cag cct agt gcg Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala 245 250 255	768
gtg gtc tta cag tgt ggc tca gac tcc cta tct ggg gat cgg tta ggt Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly 260 265 270	816
tgc ttc aat cta act atc aaa gga cac gcc aag tgt gtg gaa ttt gtc Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val 275 280 285	864
aag agc ttt aac ctg cct atg ctg atg ctg gga ggc ggt ggt tac acc Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Tyr Thr 290 295 300	912
att cgt aac gtt gcc cgg tgc agg aca tat gag aca gct gtg gcc ctg Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu 305 310 315 320	960
gat acg gag atc cct aat gag ctt cca tac aat gac tac ttt gaa tac Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr 325 330 335	1008
ttt gga cca gat ttc aag ctc cac atc agt cct tcc aat atg act aac Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn 340 345 350	1056
cag aac acg aat gag tac ctg gag aag atc aaa cag cga ctg ttt gag	1104

58/123

Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu	
355 360 365	
aac ctt aga atg ctg ccg cac gca cct ggg gtc caa atg cag gcg att	1152
Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile	
370 375 380	
cct gag gac gcc atc cct gag gag agt ggc gat gag gac gaa gac gac	1200
Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp	
385 390 395 400	
cct gac aag cgc atc tcg atc tgc tcc tct gac aaa cga att gcc tgt	1248
Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys	
405 410 415	
gag gaa gag ttc tcc gat tct gaa gag gag gga gag ggg ggc cgc aag	1296
Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys	
420 425 430	
aac tct tcc aac ttc aaa aaa gcc aag aga gtc aaa aca gag gat gaa	1344
Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu	
435 440 445	
aaa gag aaa gac cca gag gag aag aaa gaa gtc acc gaa gag gag aaa	1392
Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys	
450 455 460	
acc aag gag gag aag cca gaa gcc aaa ggg gtc aag gag gag gtc aag	1440
Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys	
465 470 475 480	
ttg gcc tga	1449
Leu Ala	

59/123

&lt;211&gt; 482

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1  
(HDAC1) gene

&lt;400&gt; 12

Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp  
1 5 10 15

Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro  
20 25 30

His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr  
35 40 45

Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met  
50 55 60

Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val  
85 90 95

Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu  
100 105 110

60/123

Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln  
115 120 125

Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu Lys Leu Ala Lys Lys  
130 135 140

Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile  
145 150 155 160

Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp  
165 170 175

Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg  
180 185 190

Val Met Thr Val Ser Phe His Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr  
195 200 205

Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val  
210 215 220

Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile  
225 230 235 240

Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala  
245 250 255

Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly

61/123

260

265

270

Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val  
275 280 285

Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Tyr Thr  
290 295 300

Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu  
305 310 315 320

Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr  
325 330 335

Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn  
340 345 350

Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu  
355 360 365

Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile  
370 375 380

Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp  
385 390 395 400

Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys  
405 410 415

62/123

Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys  
 420 425 430

Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu  
 435 440 445

Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys  
 450 455 460

Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys  
 465 470 475 480

Leu Ala

<210> 13

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1449)

<223> Dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1)  
 gene

<400> 13

atg gcg cag acg cag ggc acc cgg agg aaa gtc tgt tac tac tac gac  
 Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp  
 1 5 10 15

48

63/123

ggg gat gtt gga aat tac tat tat gga caa ggc cac cca atg aag cct	96
Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro	
20 25 30	
cac cga atc cgc atg act cat aat ttg ctg ctc aac tat ggt ctc tac	144
His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr	
35 40 45	
cga aaa atg gaa atc tat cgc cct cac aaa gcc aat gct gag gag atg	192
Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met	
50 55 60	
acc aag tac cac agc gat gac tac att aaa ttc ttg cgc tcc atc cgt	240
Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg	
65 70 75 80	
cca gat aac atg tcg gag tac agc aag cag atg cag aga ttc aac gtt	288
Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val	
85 90 95	
ggt gag gac tgt cca gta ttc gat ggc ctg ttt gag ttc tgt cag ttg	336
Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu	
100 105 110	
tct act ggt ggt tct gtg gca agt gct gtg aaa ctt aat aag cag cag	384
Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln	
115 120 125	
acg gac atc gct gtg aat tgg gct ggg ggc ctg cac cat gca aag aag	432
Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys	
130 135 140	
tcc gag gca tct ggc ttc tgt tac gtc aat gat atc gtc ttg gcc atc	480
Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile	
145 150 155 160	



64/123

ctg gaa ctg cta aag tat cac cag agg gtg ctg tac att gac att gat	528
Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp	
165 170 175	
att cac cat ggt gac ggc gtg gaa gag gcc ttc tac acc acg gac cgg	576
Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg	
180 185 190	
gtc atg act gtg tcc ttt ctt aag tat gga gag tac ttc cca gga act	624
Val Met Thr Val Ser Phe Leu Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr	
195 200 205	
ggg gac cta cgg gat atc ggg gct ggc aaa ggc aag tat tat gct gtt	672
Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val	
210 215 220	
aac tac ccg ctc cga gac ggg att gat gac gag tcc tat gag gcc att	720
Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile	
225 230 235 240	
ttc aag ccg gtc atg tcc aaa gta atg gag atg ttc cag cct agt gcg	768
Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala	
245 250 255	
gtg gtc tta cag tgt ggc tca gac tcc cta tct ggg gat cgg tta ggt	816
Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly	
260 265 270	
tgc ttc aat cta act atc aaa gga cac gcc aag tgt gtg gaa ttt gtc	864
Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val	
275 280 285	
aag agc ttt aac ctg cct atg ctg atg ctg gga ggc ggt ggt tac acc	912
Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr	
290 295 300	
att cgt aac gtt gcc cgg tgc agg aca tat gag aca gct gtg gcc ctg	960

Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu	
305	310 315 320
gat acg gag atc cct aat gag ctt cca tac aat gac tac ttt gaa tac	1008
Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr	
325 330 335	
ttt gga cca gat ttc aag ctc cac atc agt cct tcc aat atg act aac	1056
Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn	
340 345 350	
cag aac acg aat gag tac ctg gag aag atc aaa cag cga ctg ttt gag	1104
Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu	
355 360 365	
aac ctt aga atg ctg ccg cac gca cct ggg gtc caa atg cag gcg att	1152
Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile	
370 375 380	
cct gag gac gcc atc cct gag gag agt ggc gat gag gac gaa gac gac	1200
Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp	
385 390 395 400	
cct gac aag cgc atc tcg atc tgc tcc tct gac aaa cga att gcc tgt	1248
Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys	
405 410 415	
gag gaa gag ttc tcc gat tct gaa gag gag gga gag ggg ggc cgc aag	1296
Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys	
420 425 430	
aac tct tcc aac ttc aaa aaa gcc aag aga gtc aaa aca gag gat gaa	1344
Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu	
435 440 445	
aaa gag aaa gac cca gag gag aag aaa gaa gtc acc gaa gag gag aaa	1392
Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys	

66/123

450                      455                      460  
 acc aag gag gag aag cca gaa gcc aaa ggg gtc aag gag gag gtc aag      1440  
 Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys  
 465                      470                      475                      480  
  
 ttg gcc tga    1449  
 Leu Ala

<210> 14  
 <211> 482  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1)  
 gene

<400> 14  
 Met Ala Gln Thr Gln Gly Thr Arg Arg Lys Val Cys Tyr Tyr Tyr Asp  
 1                      5                      10                      15

Gly Asp Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro  
 20                      25                      30

His Arg Ile Arg Met Thr His Asn Leu Leu Leu Asn Tyr Gly Leu Tyr  
 35                      40                      45

Arg Lys Met Glu Ile Tyr Arg Pro His Lys Ala Asn Ala Glu Glu Met  
 50                      55                      60

67/123

Thr Lys Tyr His Ser Asp Asp Tyr Ile Lys Phe Leu Arg Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Pro Asp Asn Met Ser Glu Tyr Ser Lys Gln Met Gln Arg Phe Asn Val  
85 90 95

Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp Gly Leu Phe Glu Phe Cys Gln Leu  
100 105 110

Ser Thr Gly Gly Ser Val Ala Ser Ala Val Lys Leu Asn Lys Gln Gln  
115 120 125

Thr Asp Ile Ala Val Asn Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys  
130 135 140

Ser Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile  
145 150 155 160

Leu Glu Leu Leu Lys Tyr His Gln Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp  
165 170 175

Ile His His Gly Asp Gly Val Glu Glu Ala Phe Tyr Thr Thr Asp Arg  
180 185 190

Val Met Thr Val Ser Phe Leu Lys Tyr Gly Glu Tyr Phe Pro Gly Thr  
195 200 205

Gly Asp Leu Arg Asp Ile Gly Ala Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Ala Val

68/123

210

215

220

Asn Tyr Pro Leu Arg Asp Gly Ile Asp Asp Glu Ser Tyr Glu Ala Ile  
225 230 235 240

Phe Lys Pro Val Met Ser Lys Val Met Glu Met Phe Gln Pro Ser Ala  
245 250 255

Val Val Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly  
260 265 270

Cys Phe Asn Leu Thr Ile Lys Gly His Ala Lys Cys Val Glu Phe Val  
275 280 285

Lys Ser Phe Asn Leu Pro Met Leu Met Leu Gly Gly Gly Tyr Thr  
290 295 300

Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Arg Thr Tyr Glu Thr Ala Val Ala Leu  
305 310 315 320

Asp Thr Glu Ile Pro Asn Glu Leu Pro Tyr Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr  
325 330 335

Phe Gly Pro Asp Phe Lys Leu His Ile Ser Pro Ser Asn Met Thr Asn  
340 345 350

Gln Asn Thr Asn Glu Tyr Leu Glu Lys Ile Lys Gln Arg Leu Phe Glu  
355 360 365

69/123

Asn Leu Arg Met Leu Pro His Ala Pro Gly Val Gln Met Gln Ala Ile  
370 375 380

Pro Glu Asp Ala Ile Pro Glu Glu Ser Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp  
385 390 395 400

Pro Asp Lys Arg Ile Ser Ile Cys Ser Ser Asp Lys Arg Ile Ala Cys  
405 410 415

Glu Glu Glu Phe Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly Glu Gly Gly Arg Lys  
420 425 430

Asn Ser Ser Asn Phe Lys Lys Ala Lys Arg Val Lys Thr Glu Asp Glu  
435 440 445

Lys Glu Lys Asp Pro Glu Glu Lys Lys Glu Val Thr Glu Glu Glu Lys  
450 455 460

Thr Lys Glu Glu Lys Pro Glu Ala Lys Gly Val Lys Glu Glu Val Lys  
465 470 475 480

Leu Ala

<210> 15

<211> 1287

<212> DNA

<213> Homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; CDS

<222> (1)..(1287)

<223> human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 15

atg gcc aag acc gtg gcc tat ttc tac gac ccc gac gtg ggc aac ttc 48  
Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe  
1 5 10 15

cac tac gga gct gga cac cct atg aag ccc cat cgc ctg gca ttg acc 96  
His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr  
20 25 30

cat agc ctg gtc ctg cat tac ggt ctc tat aag aag atg atc gtc ttc 144  
His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe  
35 40 45

aag cca tac cag gcc tcc caa cat gac atg tgc cgc ttc cac tcc gag 192  
Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu  
50 55 60

gac tac att gac ttc ctg cag aga gtc agc ccc acc aat atg caa ggc 240  
Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly  
65 70 75 80

ttc acc aag agt ctt aat gcc ttc aac gta ggc gat gac tgc cca gtg 288  
Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val  
85 90 95

ttt ccc ggg ctc ttt gag ttc tgc tgc cgt tac aca ggc gca tct ctg 336  
 Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu  
 100 105 110

caa gga gca acc cag ctg aac aac aag atc tgt gat att gcc att aac 384

71/123

Gln Gly Ala Thr Gln Leu Asn Asn Lys Ile Cys Asp Ile Ala Ile Asn	
115 120 125	
tgg gct ggt ggt ctg cac cat gcc aag aag ttt gag gcc tct ggc ttc	432
Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe	
130 135 140	
tgc tat gtc aac gac att gtg att ggc atc ctg gag ctg ctc aag tac	480
Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr	
145 150 155 160	
cac cct cgg gtg ctc tac att gac att gac atc cac cat ggt gac ggg	528
His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly	
165 170 175	
gtt caa gaa gct ttc tac ctc act gac cgg gtc atg acg gtg tcc ttc	576
Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe	
180 185 190	
cac aaa tac gga aat tac ttc ttc cct ggc aca ggt gac atg tat gaa	624
His Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu	
195 200 205	
gtc ggg gca gag agt ggc cgc tac tac tgt ctg aac gtg ccc ctg cgg	672
Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg	
210 215 220	
gat ggc att gat gac cag agt tac aag cac ctt ttc cag ccg gtt atc	720
Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile	
225 230 235 240	
aac cag gta gtg gac ttc tac caa ccc acg tgc att gtg ctc cag tgt	768
Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys	
245 250 255	
gga gct gac tct ctg ggc tgt gat cga ttg ggc tgc ttt aac ctc agc	816
Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser	



72/123

260	265	270	
atc cga ggg cat ggg gaa tgc gtt gaa tat gtc aag agc ttc aat atc			864
Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile			
275	280	285	
cct cta ctc gtg ctg ggt ggt ggt ggt tat act gtc cga aat gtt gcc			912
Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala			
290	295	300	
cgc tgc tgg aca tat gag aca tcg ctg ctg gta gaa gag gcc att agt			960
Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser			
305	310	315	320
gag gag ctt ccc tat agt gaa tac ttc gag tac ttt gcc cca gac ttc			1008
Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe			
325	330	335	
aca ctt cat cca gat gtc agc acc cgc atc gag aat cag aac tca cgc			1056
Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg			
340	345	350	
cag tat ctg gac cag atc ctc cag aca atc ttt gaa aac ctg aag atg			1104
Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met			
355	360	365	
ctg aac cat gca cct agt gtc cag att cat gac gtg cct gca gac ctc			1152
Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu			
370	375	380	
ctg acc tat gac agg act gat gag gct gat gca gag gag agg ggt cct			1200
Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro			
385	390	395	400
gag gag aac tat agc agg cca gag gca ccc aat gag ttc tat gat gga			1248
Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly			
405	410	415	

73/123

gac cat gac aat gac aag gaa agc gat gtg gag att taa 1287  
Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile  
420 425

<210> 16  
<211> 428  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe  
1 5 10 15

His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr  
20 25 30

His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe  
35 40 45

Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu  
50 55 60

Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly  
65 70 75 80

Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val  
85 90 95

Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu

74/123

100

105

110

Gln Gly Ala Thr Gln Leu Asn Asn Lys Ile Cys Asp Ile Ala Ile Asn  
115 120 125

Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe  
130 135 140

Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr  
145 150 155 160

His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly  
165 170 175

Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe  
180 185 190

His Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu  
195 200 205

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg  
210 215 220

Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile  
225 230 235 240

Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys  
245 250 255

Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser  
260 265 270

Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile  
275 280 285

Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala  
290 295 300

Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser  
305 310 315 320

Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe  
325 330 335

Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg  
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met  
355 360 365

Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu  
370 375 380

Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro  
385 390 395 400

76/123

Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly  
 405 410 415

Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile  
 420 425

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1287

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1287)

<223> Dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3  
 (HDAC3) gene

&lt;400&gt; 17

atg gcc aag acc gtg gcc tat ttc tac gac ccc gac gtg ggc aac ttc 48  
 Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe  
 1 5 10 15

cac tac gga gct gga cac cct atg aag ccc cat cgc ctg gca ttg acc 96  
 His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr  
 20 25 30

cat agc ctg gtc ctg cat tac ggt ctc tat aag aag atg atc gtc ttc 144  
 His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe  
 35 40 45

aag cca tac cag gcc tcc caa cat gac atg tgc cgc ttc cac tcc gag 192  
 Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu  
 50 55 60

77/123

gac tac att gac ttc ctg cag aga gtc agc ccc acc aat atg caa ggc	240
Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly	
65                      70                      75                      80	
ttc acc aag agt ctt aat gcc ttc aac gta ggc gat gac tgc cca gtg	288
Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val	
85                      90                      95	
ttt ccc ggg ctc ttt gag ttc tgc tcg cgt tac aca ggc gca tct ctg	336
Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu	
100                      105                      110	
caa gga gca acc cag ctg aac aac aag atc tgt gat att gcc att aac	384
Gln Gly Ala Thr Gln Leu Asn Asn Lys Ile Cys Asp Ile Ala Ile Asn	
115                      120                      125	
tgg gct ggt ggt ctg aag ctt gcc aag aag ttt gag gcc tct ggc ttc	432
Trp Ala Gly Gly Leu Lys Leu Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe	
130                      135                      140	
tgc tat gtc aac gac att gtg att ggc atc ctg gag ctg ctc aag tac	480
Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr	
145                      150                      155                      160	
cac cct cgg gtg ctc tac att gac att gac atc cac cat ggt gac ggc	528
His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly	
165                      170                      175	
gtt caa gaa gct ttc tac ctc act gac cgg gtc atg acg gtg tcc ttc	576
Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe	
180                      185                      190	
cac aaa tac gga aat tac ttc ttc cct ggc aca ggt gac atg tat gaa	624
His Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu	
195                      200                      205	
gtc ggg gca gag agt ggc cgc tac tac tgt ctg aac gtg ccc ctg cgg	672

78/123

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg	
210 215 220	
gat ggc att gat gac cag agt tac aag cac ctt ttc cag ccg gtt atc	720
Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile	
225 230 235 240	
aac cag gta gtg gac ttc tac caa ccc acg tgc att gtg ctc cag tgt	768
Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys	
245 250 255	
gga gct gac tct ctg ggc tgt gat cga ttg ggc tgc ttt aac ctc agc	816
Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser	
260 265 270	
atc cga ggg cat ggg gaa tgc gtt gaa tat gtc aag agc ttc aat atc	864
Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile	
275 280 285	
cct cta ctc gtg ctg ggt ggt ggt ggt tat act gtc cga aat gtt gcc	912
Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala	
290 295 300	
cgc tgc tgg aca tat gag aca tcg ctg ctg gta gaa gag gcc att agt	960
Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser	
305 310 315 320	
gag gag ctt ccc tat agt gaa tac ttc gag tac ttt gcc cca gac ttc	1008
Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe	
325 330 335	
aca ctt cat cca gat gtc agc acc cgc atc gag aat cag aac tca cgc	1056
Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg	
340 345 350	
cag tat ctg gac cag atc ctc cag aca atc ttt gaa aac ctg aag atg	1104
Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met	

79/123

355	360	365	
ctg aac cat gca cct agt gtc cag att cat gac gtg cct gca gac ctc			1152
Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu			
370	375	380	
ctg acc tat gac agg act gat gag gct gat gca gag gag agg ggt cct			1200
Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro			
385	390	395	400
gag gag aac tat agc agg cca gag gca ccc aat gag ttc tat gat gga			1248
Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly			
405	410	415	
gac cat gac aat gac aag gaa agc gat gtg gag att taa			1287
Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile			
420	425		
<210> 18			
<211> 428			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene			
<400> 18			
Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe			
1	5	10	15
His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr			
20	25	30	



80/123

His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe  
35 40 45

Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu  
50 55 60

Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly  
65 70 75 80

Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val  
85 90 95

Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu  
100 105 110

Gln Gly Ala Thr Gln Leu Asn Asn Lys Ile Cys Asp Ile Ala Ile Asn  
115 120 125

Trp Ala Gly Gly Leu Lys Leu Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe  
130 135 140

Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr  
145 150 155 160

His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly  
165 170 175

Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe

81/123

180

185

190

His Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu  
195 200 205

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg  
210 215 220

Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile  
225 230 235 240

Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys  
245 250 255

Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser  
260 265 270

Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile  
275 280 285

Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala  
290 295 300

Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser  
305 310 315 320

Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe  
325 330 335

82/123

Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg  
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met  
355 360 365

Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu  
370 375 380

Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro  
385 390 395 400

Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly  
405 410 415

Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile  
420 425

<210> 19

<211> 1287

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1287)

<223> Dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3)  
gene

83/123

<400> 19  
 atg gcc aag acc gtg gcc tat ttc tac gac ccc gac gtg ggc aac ttc 48  
 Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe  
 1 5 10 15  
  
 cac tac gga gct gga cac cct atg aag ccc cat cgc ctg gca ttg acc 96  
 His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr  
 20 25 30  
  
 cat agc ctg gtc ctg cat tac ggt ctc tat aag aag atg atc gtc ttc 144  
 His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe  
 35 40 45  
  
 aag cca tac cag gcc tcc caa cat gac atg tgc cgc ttc cac tcc gag 192  
 Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu  
 50 55 60  
  
 gac tac att gac ttc ctg cag aga gtc agc ccc acc aat atg caa ggc 240  
 Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly  
 65 70 75 80  
  
 ttc acc aag agt ctt aat gcc ttc aac gta ggc gat gac tgc cca gtg 288  
 Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val  
 85 90 95  
  
 ttt ccc ggg ctc ttt gag ttc tgc tgc cgt tac aca ggc gca tct ctg 336  
 Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu  
 100 105 110  
  
 caa gga gca acc cag ctg aac aac aag atc tgt gat att gcc att aac 384  
 Gln Gly Ala Thr Gln Leu Asn Asn Lys Ile Cys Asp Ile Ala Ile Asn  
 115 120 125  
  
 tgg gct ggt ggt ctg cac cat gcc aag aag ttt gag gcc tct ggc ttc 432  
 Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe  
 130 135 140

84/123

tgc tat gtc aac gac att gtg att ggc atc ctg gag ctg ctc aag tac	480
Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr	
145                                      150                                      155                                      160	
 cac cct cgg gtg ctc tac att gac att gac atc cac cat ggt gac ggg	528
His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly	
165                                      170                                      175	
 gtt caa gaa gct ttc tac ctc act gac cgg gtc atg acg gtg tcc ttc	576
Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe	
180                                      185                                      190	
 ctt aaa tac gga aat tac ttc ttc cct ggc aca ggt gac atg tat gaa	624
Leu Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu	
195                                      200                                      205	
 gtc ggg gca gag agt ggc cgc tac tac tgt ctg aac gtg ccc ctg cgg	672
Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg	
210                                      215                                      220	
 gat ggc att gat gac cag agt tac aag cac ctt ttc cag ccg gtt atc	720
Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile	
225                                      230                                      235                                      240	
 aac cag gta gtg gac ttc tac caa ccc acg tgc att gtg ctc cag tgt	768
Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys	
245                                      250                                      255	
 gga gct gac tct ctg ggc tgt gat cga ttg ggc tgc ttt aac ctc agc	816
Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser	
260                                      265                                      270	
 atc cga ggg cat ggg gaa tgc gtt gaa tat gtc aag agc ttc aat atc	864
Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile	
275                                      280                                      285	
 cct cta ctc gtg ctg ggt ggt ggt ggt tat act gtc cga aat gtt gcc	912

85/123

Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala	
290 295 300	
cgc tgc tgg aca tat gag aca tcg ctg ctg gta gaa gag gcc att agt	960
Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser	
305 310 315 320	
gag gag ctt ccc tat agt gaa tac ttc gag tac ttt gcc cca gac ttc	1008
Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe	
325 330 335	
aca ctt cat cca gat gtc agc acc cgc atc gag aat cag aac tca cgc	1056
Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg	
340 345 350	
cag tat ctg gac cag atc ctc cag aca atc ttt gaa aac ctg aag atg	1104
Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met	
355 360 365	
ctg aac cat gca cct agt gtc cag att cat gac gtg cct gca gac ctc	1152
Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu	
370 375 380	
ctg acc tat gac agg act gat gag gct gat gca gag gag agg ggt cct	1200
Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro	
385 390 395 400	
gag gag aac tat agc agg cca gag gca ccc aat gag ttc tat gat gga	1248
Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly	
405 410 415	
gac cat gac aat gac aag gaa agc gat gtg gag att taa	1287
Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile	
420 425	

&lt;210&gt; 20

WO 2004/061101

86/123

<211> 428  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3)  
 gene

<400> 20  
 Met Ala Lys Thr Val Ala Tyr Phe Tyr Asp Pro Asp Val Gly Asn Phe  
 1 5 10 15

His Tyr Gly Ala Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Leu Ala Leu Thr  
 20 25 30

His Ser Leu Val Leu His Tyr Gly Leu Tyr Lys Lys Met Ile Val Phe  
 35 40 45

Lys Pro Tyr Gln Ala Ser Gln His Asp Met Cys Arg Phe His Ser Glu  
 50 55 60

Asp Tyr Ile Asp Phe Leu Gln Arg Val Ser Pro Thr Asn Met Gln Gly  
 65 70 75 80

Phe Thr Lys Ser Leu Asn Ala Phe Asn Val Gly Asp Asp Cys Pro Val  
 85 90 95

Phe Pro Gly Leu Phe Glu Phe Cys Ser Arg Tyr Thr Gly Ala Ser Leu  
 100 105 110

87/123

Gln Gly Ala Thr Gln Leu Asn Asn Lys Ile Cys Asp Ile Ala Ile Asn  
115 120 125

Trp Ala Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Phe Glu Ala Ser Gly Phe  
130 135 140

Cys Tyr Val Asn Asp Ile Val Ile Gly Ile Leu Glu Leu Leu Lys Tyr  
145 150 155 160

His Pro Arg Val Leu Tyr Ile Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly  
165 170 175

Val Gln Glu Ala Phe Tyr Leu Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe  
180 185 190

Leu Lys Tyr Gly Asn Tyr Phe Phe Pro Gly Thr Gly Asp Met Tyr Glu  
195 200 205

Val Gly Ala Glu Ser Gly Arg Tyr Tyr Cys Leu Asn Val Pro Leu Arg  
210 215 220

Asp Gly Ile Asp Asp Gln Ser Tyr Lys His Leu Phe Gln Pro Val Ile  
225 230 235 240

Asn Gln Val Val Asp Phe Tyr Gln Pro Thr Cys Ile Val Leu Gln Cys  
245 250 255

Gly Ala Asp Ser Leu Gly Cys Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser



88/123

260

265

270

Ile Arg Gly His Gly Glu Cys Val Glu Tyr Val Lys Ser Phe Asn Ile  
275 280 285

Pro Leu Leu Val Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Val Arg Asn Val Ala  
290 295 300

Arg Cys Trp Thr Tyr Glu Thr Ser Leu Leu Val Glu Glu Ala Ile Ser  
305 310 315 320

Glu Glu Leu Pro Tyr Ser Glu Tyr Phe Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Phe  
325 330 335

Thr Leu His Pro Asp Val Ser Thr Arg Ile Glu Asn Gln Asn Ser Arg  
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Gln Ile Leu Gln Thr Ile Phe Glu Asn Leu Lys Met  
355 360 365

Leu Asn His Ala Pro Ser Val Gln Ile His Asp Val Pro Ala Asp Leu  
370 375 380

Leu Thr Tyr Asp Arg Thr Asp Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Gly Pro  
385 390 395 400

Glu Glu Asn Tyr Ser Arg Pro Glu Ala Pro Asn Glu Phe Tyr Asp Gly  
405 410 415

89/123

Asp His Asp Asn Asp Lys Glu Ser Asp Val Glu Ile  
 420 425

<210> 21  
 <211> 1458  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1458)  
 <223> human N-CoR (RD3) gene

<400> 21  
 gaa gtc ctt cag cct gct cca cat caa gtg ata act aat ctc cct gaa 48  
 Glu Val Leu Gln Pro Ala Pro His Gln Val Ile Thr Asn Leu Pro Glu  
 1 5 10 15  
 ggc gtt cgg ctt ccg aca act cga cca acc agg cca ccg ccc cct ctc 96  
 Gly Val Arg Leu Pro Thr Thr Arg Pro Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu  
 20 25 30  
 atc ccg tca tcc aaa acc aca gtg gct tca gaa aaa cca tct ttt ata 144  
 Ile Pro Ser Ser Lys Thr Thr Val Ala Ser Glu Lys Pro Ser Phe Ile  
 35 40 45  
 atg gga ggc tcc atc tca cag gga aca cca ggc act tat ttg act tct 192  
 Met Gly Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Gly Thr Tyr Leu Thr Ser  
 50 55 60  
 cat aat cag gct tcc tac act caa gaa aca ccc aag ccg tca gta gga 240  
 His Asn Gln Ala Ser Tyr Thr Gln Glu Thr Pro Lys Pro Ser Val Gly  
 65 70 75 80

90/123

tct atc tct ctt gga ctg cca cgg caa cag gaa tct gcc aaa tca gct	288
Ser Ile Ser Leu Gly Leu Pro Arg Gln Gln Glu Ser Ala Lys Ser Ala	
85 90 95	
act ttg ccc tac atc aag cag gaa gaa ttt tct ccc cga agc caa aac	336
Thr Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Glu Phe Ser Pro Arg Ser Gln Asn	
100 105 110	
tca caa cct gag ggt ctg ttg gtc agg gcc caa cat gaa ggt gta gtc	384
Ser Gln Pro Glu Gly Leu Leu Val Arg Ala Gln His Glu Gly Val Val	
115 120 125	
aga ggt acc gca gga gcc ata caa gaa gga agt ata act cgg gga act	432
Arg Gly Thr Ala Gly Ala Ile Gln Glu Gly Ser Ile Thr Arg Gly Thr	
130 135 140	
cca acc agc aaa att tca gtg gag agc att cca tcc cta cgg ggc tct	480
Pro Thr Ser Lys Ile Ser Val Glu Ser Ile Pro Ser Leu Arg Gly Ser	
145 150 155 160	
atc act cag ggc acc ccg gct ctg ccc cag act ggc ata cca aca gag	528
Ile Thr Gln Gly Thr Pro Ala Leu Pro Gln Thr Gly Ile Pro Thr Glu	
165 170 175	
gct ttg gtg aag ggg tcc att tcg aga atg ccc att gaa gac agc agt	576
Ala Leu Val Lys Gly Ser Ile Ser Arg Met Pro Ile Glu Asp Ser Ser	
180 185 190	
cct gag aaa ggc aga gag gaa gct gca tcc aaa ggc cat gtt att tat	624
Pro Glu Lys Gly Arg Glu Glu Ala Ala Ser Lys Gly His Val Ile Tyr	
195 200 205	
gaa ggc aaa agt gga cat atc ttg tca tat gat aat att aag aat gcc	672
Glu Gly Lys Ser Gly His Ile Leu Ser Tyr Asp Asn Ile Lys Asn Ala	
210 215 220	
cga gaa ggg act agg agt cca aga aca gct cat gaa atc agt tta aag	720

91/123

Arg Glu Gly Thr Arg Ser Pro Arg Thr Ala His Glu Ile Ser Leu Lys			
225	230	235	240
aga agc tat gaa tca gtg gaa gga aat ata aag caa ggg atg tca atg	768		
Arg Ser Tyr Glu Ser Val Glu Gly Asn Ile Lys Gln Gly Met Ser Met			
245	250	255	
agg gag tct cct gta tca gca ccg tta gag ggg ctg ata tgc cga gca	816		
Arg Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Glu Gly Leu Ile Cys Arg Ala			
260	265	270	
tta ccc agg ggg agt cct cat tct gac ctc aaa gaa agg act gta ttg	864		
Leu Pro Arg Gly Ser Pro His Ser Asp Leu Lys Glu Arg Thr Val Leu			
275	280	285	
tct ggc tcc ata atg cag ggg aca cca aga gca aca act gaa agc ttt	912		
Ser Gly Ser Ile Met Gln Gly Thr Pro Arg Ala Thr Thr Glu Ser Phe			
290	295	300	
gaa gat ggc ctt aaa tat ccc aaa caa att aaa agg gaa agt cct ccc	960		
Glu Asp Gly Leu Lys Tyr Pro Lys Gln Ile Lys Arg Glu Ser Pro Pro			
305	310	315	320
ata cga gca ttt gaa ggt gcc att acc aaa gga aaa cca tat gat ggc	1008		
Ile Arg Ala Phe Glu Gly Ala Ile Thr Lys Gly Lys Pro Tyr Asp Gly			
325	330	335	
atc acc acc atc aaa gaa atg ggg cgt tcc att cat gag att cca agg	1056		
Ile Thr Thr Ile Lys Glu Met Gly Arg Ser Ile His Glu Ile Pro Arg			
340	345	350	
caa gat att tta act cag gaa agt cgg aaa act cca gaa gtg gtc cag	1104		
Gln Asp Ile Leu Thr Gln Glu Ser Arg Lys Thr Pro Glu Val Val Gln			
355	360	365	
agc aca cgg ccg ata att gag ggt tcc att tcc cag ggc aca cca ata	1152		
Ser Thr Arg Pro Ile Ile Glu Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Ile			

92/123

370	375	380	
aag ttt gac aac aac tca ggt caa tct gcc atc aaa cac aat gtc aaa			1200
Lys Phe Asp Asn Asn Ser Gly Gln Ser Ala Ile Lys His Asn Val Lys			
385	390	395	400
tcc tta atc acg ggg cct agc aaa cta tcc cgt gga atg cct ccg ctg			1248
Ser Leu Ile Thr Gly Pro Ser Lys Leu Ser Arg Gly Met Pro Pro Leu			
405	410		415
gaa att gtg cca gag aac ata aaa gtg gta gaa cgg gga aaa tat gag			1296
Glu Ile Val Pro Glu Asn Ile Lys Val Val Glu Arg Gly Lys Tyr Glu			
420	425		430
gat gtg aaa gca ggc gag acc gtg cgt tcc cgg cac acg tca gtg gta			1344
Asp Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Arg Ser Arg His Thr Ser Val Val			
435	440		445
agc tct ggc ccc tcc gtt ctt agg tcc aca ctg cat gaa gct ccc aaa			1392
Ser Ser Gly Pro Ser Val Leu Arg Ser Thr Leu His Glu Ala Pro Lys			
450	455		460
gca caa ctg agc cct ggg att tat gat gac acc agt gca cgg agg acc			1440
Ala Gln Leu Ser Pro Gly Ile Tyr Asp Asp Thr Ser Ala Arg Arg Thr			
465	470	475	480
cct gtg agt tat caa aac			1458
Pro Val Ser Tyr Gln Asn			
485			

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 486

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

93/123

Glu Val Leu Gln Pro Ala Pro His Gln Val Ile Thr Asn Leu Pro Glu  
1                      5                      10                      15

Gly Val Arg Leu Pro Thr Thr Arg Pro Thr Arg Pro Pro Pro Pro Leu  
                    20                      25                      30

Ile Pro Ser Ser Lys Thr Thr Val Ala Ser Glu Lys Pro Ser Phe Ile  
                    35                      40                      45

Met Gly Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Gly Thr Tyr Leu Thr Ser  
                    50                      55                      60

His Asn Gln Ala Ser Tyr Thr Gln Glu Thr Pro Lys Pro Ser Val Gly  
65                      70                      75                      80

Ser Ile Ser Leu Gly Leu Pro Arg Gln Gln Glu Ser Ala Lys Ser Ala  
                    85                      90                      95

Thr Leu Pro Tyr Ile Lys Gln Glu Glu Phe Ser Pro Arg Ser Gln Asn  
                    100                      105                      110

Ser Gln Pro Glu Gly Leu Leu Val Arg Ala Gln His Glu Gly Val Val  
                    115                      120                      125

Arg Gly Thr Ala Gly Ala Ile Gln Glu Gly Ser Ile Thr Arg Gly Thr  
                    130                      135                      140

Pro Thr Ser Lys Ile Ser Val Glu Ser Ile Pro Ser Leu Arg Gly Ser

94/123

145	150	155	160
Ile Thr Gln Gly Thr Pro Ala Leu Pro Gln Thr Gly Ile Pro Thr Glu			
	165	170	175
Ala Leu Val Lys Gly Ser Ile Ser Arg Met Pro Ile Glu Asp Ser Ser			
	180	185	190
Pro Glu Lys Gly Arg Glu Glu Ala Ala Ser Lys Gly His Val Ile Tyr			
	195	200	205
Glu Gly Lys Ser Gly His Ile Leu Ser Tyr Asp Asn Ile Lys Asn Ala			
	210	215	220
Arg Glu Gly Thr Arg Ser Pro Arg Thr Ala His Glu Ile Ser Leu Lys			
	225	230	235 240
Arg Ser Tyr Glu Ser Val Glu Gly Asn Ile Lys Gln Gly Met Ser Met			
	245	250	255
Arg Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu Glu Gly Leu Ile Cys Arg Ala			
	260	265	270
Leu Pro Arg Gly Ser Pro His Ser Asp Leu Lys Glu Arg Thr Val Leu			
	275	280	285
Ser Gly Ser Ile Met Gln Gly Thr Pro Arg Ala Thr Thr Glu Ser Phe			
	290	295	300

95/123

Glu Asp Gly Leu Lys Tyr Pro Lys Gln Ile Lys Arg Glu Ser Pro Pro  
305 310 315 320

Ile Arg Ala Phe Glu Gly Ala Ile Thr Lys Gly Lys Pro Tyr Asp Gly  
325 330 335

Ile Thr Thr Ile Lys Glu Met Gly Arg Ser Ile His Glu Ile Pro Arg  
340 345 350

Gln Asp Ile Leu Thr Gln Glu Ser Arg Lys Thr Pro Glu Val Val Gln  
355 360 365

Ser Thr Arg Pro Ile Ile Glu Gly Ser Ile Ser Gln Gly Thr Pro Ile  
370 375 380

Lys Phe Asp Asn Asn Ser Gly Gln Ser Ala Ile Lys His Asn Val Lys  
385 390 395 400

Ser Leu Ile Thr Gly Pro Ser Lys Leu Ser Arg Gly Met Pro Pro Leu  
405 410 415

Glu Ile Val Pro Glu Asn Ile Lys Val Val Glu Arg Gly Lys Tyr Glu  
420 425 430

Asp Val Lys Ala Gly Glu Thr Val Arg Ser Arg His Thr Ser Val Val  
435 440 445



96/123

Ser Ser Gly Pro Ser Val Leu Arg Ser Thr Leu His Glu Ala Pro Lys  
 450 455 460

Ala Gln Leu Ser Pro Gly Ile Tyr Asp Asp Thr Ser Ala Arg Arg Thr  
 465 470 475 480

Pro Val Ser Tyr Gln Asn  
 485

<210> 23

<211> 731

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(731)

<223> 5'-flanking region of Human interleukin-2 (IL-2) gene

<400> 23

ctgagtat	ttt aacaatcgca ccc	tttaaaa aatgtacaat agacattaag agact	ttaaac	60
agatatataa	tcatttttaa	ttaaaatagc gttaaacagt ac	tcaagct caataagcat	120
tttaagtatt	cta	atcttag tatttctcta gctgacatgt	aagaagcaat ctatcttatt	180
gtatgcaatt	agctcattgt	gtggataaaa aggtaaaacc attctgaaac	aggaaaccaa	240
tacacttcct	gtttaatcaa	caa	atctaaa catttattct tttcatctgt	ttactcttgc 300
tcttgtccac	cacaatatgc	tattcacatg ttcagtgtag	ttttaggaca aagaaaattt	360
tctgagttac	ttttgtatcc	ccacccctt aaagaaagga	ggaaaaactg tttcatacag	420

97/123

aaggcgtaa ttgcatgaat tagagctatc acctaagtgt gggctaattgt aacaaagagg 480  
gatttcacct acatccattc agtcagtctt tgggggttta aagaaattcc aaagagtcac 540  
cagaagagga aaaatgaagg taatgttttt tcagacaggt aaagtctttg aaaatatgtg 600  
taatatgtaa aacattttga ccccccata atatttttcc agaattaaca gtataaattg 660  
catctcttgt tcaagagttc cctatcactc tctttaatca ctactcacag taacctcaac 720  
tcctgccaca a 731

<210> 24  
<211> 527  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (73)..(506)  
<223> 5'-flanking region of Human interleukin-2 (IL-2) gene

<400> 24  
gggnnnnnng gngatcctct accactatag ggogaattga atttagcggc cgcganttcg 60  
cccttcgcta gctgctcttg tccaccacaa tatgctattc acatgttcag ttagtattta 120  
ggacaaagaa aattttctga gttacttttg tatccccacc cccttaaaga aaggaggaaa 180  
aactgtttca tacagaaggc gttaattgca tgaattagag ctatcaccta agtgtgggct 240  
aatgtaacaa agagggattt cacctacatc cattcagtca gtctttgggg gtttaaagaa 300  
attccaaaga gtcacagaa gaggaaaaat gaaggtaatg tttttcaga caggtaaagt 360  
ctttgaaaat atgtgtaata tgtaaaacat ttgacaccc ccataatatt tttccagaat 420

98/123

taacagtata aattgcatct cttgttcaag agttccctat cactctcttt aatcactact 480

cacagtaacc tcaactcctg ccacaagctt cgaagggcga attcgtt 527

<210> 25

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (57).. (875)

<223> Promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 25

tgcctcttta ctataggcg aattgaattt agcggccgcg aattgcctt tgatctatcc 60

ctggctccca cctcagtttc ccgcctccaa ggcagcatgg cgggcaagaa gttgaggcca 120

ctgtccctgg gtgttctac cccacaccc tcacccaag acagcctgtt actgcggcgc 180

caacagccac ggtgcctac atctgataag acttatctgc tgccccaggg caggccggag 240

ctggcgtaag cccagtgagg gcgctaagt agtgtgcccc tgctcccgc cagcactggc 300

ctggcctgca ggcttagcct gggtcatcaa ggtatccac aggtcttagt tcaaatccag 360

cagaacctct ctgagcctca ctcttctcac ctgcaaatg ggtacagcca catcccttct 420

ctccctgcag ccaggaagac gcacatacac aggagtctag cccacaccgg cccgcacaa 480

attaagggct ttactctctg aaaagcccag tgaagtcatg aaaccatata tgctattttc 540

atttatcttg gtttcagcct attttgcttg tctggacact acagtccacg ggagcctagg 600

99/123

tcgagcgagg tccaagaatc cccagggtgg gcagggaggg tggaagaggg cctccagtgc 660  
ccaagagggtg ccccacaagc atgggacccg cccctcccc tggactgccc caccactgg 720  
ggcaccagcc actccctggg gagggaggag gagggagaag ggaggaggagg agggaggagg 780  
gaaggagacc tcaaaggcca aggccagcca ggacaccccc tgggatacaca ctgagcttgc 840  
cacatcccca aggcggccga accctccgca accaccaaag cttataaggg cgaattcggt 900

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 660

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (11)..(647)

&lt;223&gt; Promoter region of Human GATA-1 gene

&lt;400&gt; 26

ttatgtacc acccagaag atgccaggag ggagtgagcc agtcagggaagg ggttccgag 60  
aagagaggac attgaagaag agtctcaaac ttaggcctga cggagaagac gcgcggccag 120  
gacacccac ccccgccctc gtctcccca aagcctgac tggccccact gattccctta 180  
tctgccact cccagctgcc tccttgctgg ctgaactgtc gccgcagact tctgagcctg 240  
cgccccctcc acggggatgg gggagggaat ggggtgaggg ctggcctcac agcctcgggg 300  
tttcagctc ttgctggagg cagggtcttg gggcgcccta ctctcacc ttggcttctc 360  
ttctgagcg ctctgtgctc tccagaaatg aagaaatggg gtgagtcag cgccaaacc 420

100/123

cttgtcttag ctcttagaca tgcctcgagc ctgccattcc ctgtgaggac agatttcct 480  
atgttgcgac cgctgcttct aataataata atgatgatga taattcccat ttacagagca 540  
caccatttat ggtgtgccag caggccctgt gctgagtggg tcttaccacac gtggggggct 600  
aggactttac ccgttttcca gatgaagaaa ctgaggctca gagggcgcta gcataagggc 660

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for amplifying the 5'-flanking region of Human interleukin-2  
(IL-2) gene

&lt;400&gt; 27

tcgctagcct gagtatttaa caatgcacc ct

32

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for amplifying the 5'-flanking region of Human interleukin-2  
(IL-2) gene

&lt;400&gt; 28

cgaagcttgt ggcaggagtt gaggttactg

30

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 777

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(777)

<223> Corresponding to the sequence (+661 to +1437) in the GenBank database  
(Accession: HSIL05)

<400> 29

atcagtatcc ttgaatcgaa acccttttct gagtatTTaa caatcgcacc ctttaaaaaa	60
tgtacataga cattaagaga cttaaacaga tatataatca ttttaaatta aaatagcggt	120
aaacagtacc tcaagctcaa taagcatttt aagtattcta atcttagtat ttctctagct	180
gacatgtaag aagcaatcta tcttattgta tgcaattagc tctttgtgtg gataaaaagg	240
taaaaccatt ctgaaacagg aaaccaatac acttcctggt taatcaacaa atctaaacat	300
ttattctttt catctgttta ctcttgctct tgtccaccac aatatgctat tcacatgttc	360
agtgtagttt tatgacaaag aaaattttct gagttacttt tgtatcccca ccccttaaa	420
gaaaggagga aaaactgttt catacagaag gcgttaattg catgaattag agctatcacc	480
taagtgtggg ctaatgtaac aaagagggat ttcacctaca tccattcagt cagtctttgg	540
gggtttaaag aaattccaaa gagtcatcag aagaggaaaa atgaaggtaa tgttttttca	600
gactggtaaa gtctttgaaa atatgtgtaa tatgtaaaac attttgacac ccccataata	660
tttttcaga attaacagta taaattgcat ctcttggtca agagttccct atcactcttt	720
aatcactact cacagtaacc tcaactcctg ccacaatgta caggatgcaa ctctgt	777

102/123

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying the 5'-flanking region of Human interleukin-2 (IL-2) gene

&lt;400&gt; 30

cgctagctgc tcttgtccac cacaatatgc

30

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 538

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(538)

&lt;223&gt; Corresponding to the sequence (+901 to +1438) in the GenBank database (Accession: HSIL05)

&lt;400&gt; 31

taaaaccatt ctgaaacagg aaaccaatac acttcctggt taatcaacaa atctaaacat 60

ttattctttt catctgttta ctcttgetct tgtccaccac aatatgctat tcacatgttc 120

agtgtaglit tatgacaaag aaaatcttct gagttacttt tgtatcccca cccctttaa 180

gaaaggagga aaaactgttt catacagaag gcgttaattg catgaattag agctatcacc 240

taagtgtggg ctaatgtaac aaagagggat ttcacctaca tccattcagt cagtctttgg 300

gggttttaaag aaattccaaa gagtcacag aagaggaaaa atgaaggtaa tgttttttca 360

103/123

gactggtaaa gtctttgaaa atatgtgtaa tatgtaaaac attttgacac ccccataata 420  
ttttccaga attaacagta taaattgcat ctcttggtca agagttccct atcactcttt 480  
aatcactact cacagtaacc tcaactcctg ccacaatgta caggatgcaa ctctgtgc 538

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

&lt;400&gt; 32

atagatctat ccctggctcc cacctcag 28

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

&lt;400&gt; 33

ataagctttg gtggttgagg agggttcg 28

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;



104/123

<223> PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 34

atggtaccac cccagaagat gccaggag

28

<210> 35

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying the promoter region of Human GATA-1 gene

<400> 35

atgctagcgc cctctgagcc tcagtttc

28

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 36

gaggaattca agatggcgca gac

23

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 37

ggagcggccg cttcaggcca acttg

25

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-2 (HDAC2) gene

<400> 38

gggatccat ggcgtacagt caag

24

<210> 39

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-2 (HDAC2) gene

<400> 39

ggtgcggccg ccaaattcag gggttgctg

29

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

106/123

&lt;400&gt; 40

ccggatccac catggccaag ac

22

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

&lt;400&gt; 41

gcagcgcccg ccactcttaa atctccac

28

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

&lt;400&gt; 42

gggaattcat gagctcccaa agccatcc

28

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

&lt;400&gt; 43

107/123

aaggcgccgc agcttcgagg gaggctac

29

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-5 (HDAC5) gene

&lt;400&gt; 44

ggcaagctta tgaactctcc caacgag

27

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-5 (HDAC5) gene

&lt;400&gt; 45

ggcgccgc gtcacagggc aggtcctg

29

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-6 (HDAC6) gene

&lt;400&gt; 46

108/123

gcgaagctta tgacctcaac cggccag

27

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-6 (HDAC6) gene

&lt;400&gt; 47

gcatgcggcc gcttagtgtg ggtggggcat atc

33

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-7 (HDAC7) gene

&lt;400&gt; 48

cgaattcagc cgcagcccat ggacct

26

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-7 (HDAC7) gene

&lt;400&gt; 49

cggtaccctg tgcacccgga tcacgg

26

<210> 50

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-8 (HDAC8) gene

<400> 50

cgaattcttt aagcggaaga tggagg

26

<210> 51

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-8 (HDAC8) gene

<400> 51

aggtaccgac cacatgcttc agattc

26

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for amplifying a human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 52

ctgaattcac catggccaag accg

24

110/123

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for adding a Flag sequence to a human histone deacetylase-3  
(HDAC3) gene

&lt;400&gt; 53

gggcggccgc ctacttgta tcgtcgctcct tgtaatcggc accaatctcc acatcgcttt 60

c

61

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Flag sequence

&lt;400&gt; 54

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for adding a Kpn I site to a human histone deacetylase-1  
(HDAC1) gene

111/123

&lt;400&gt; 55

atcgggtaccg gccaaacttga cctcctcctt g

31

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for adding a Kpn I site to a human histone deacetylase-2  
(HDAC2) gene

&lt;400&gt; 56

atcgggtaccg ggggttgctga gctgttctg

29

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for adding a Bgl II site to a human histone deacetylase-4  
(HDAC4) gene

&lt;400&gt; 57

gatagatctc aggggcggct cctcttc

27

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;



112/123

<223> Nucleotide sequence having a Flag nucleotide sequence

<400> 58

aattcctgca gagatctgat tacaaggacg acgatgacaa gtaggc

46

<210> 59

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Nucleotide sequence having a Flag nucleotide sequence

<400> 59

ggcgcctac ttgtcatcgt cgtccttgta atcagatctc tgcagg

46

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 60

cagtgcacc atatggaacg agg

23

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

113/123

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 61

gcaagctttc caggggggcg

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 62

ccccctggaa agcttgcgga

20

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H802K, H803L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

<400> 63

gacatgtaca ggacgctagg gt

22

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

114/123

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

&lt;400&gt; 64

cctgtacatg tccctccttc g

21

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H863L) of human histone deacetylase-4 (HDAC4) gene

&lt;400&gt; 65

atagatctag acaggggcgg

20

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-i (HDACi) gene

&lt;400&gt; 66

gaggaattca agatggcgca gac

23

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 25

115/123

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

&lt;400&gt; 67

ctcggacttc ttgcaagct tcagg

25

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

&lt;400&gt; 68

gggcctgaag cttgcaaaga agtc

24

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H140K, H141L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

&lt;400&gt; 69

gtgaatatca atgtcaatgt acagc

25

116/123

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

&lt;400&gt; 70

gacggcgtgg aagaggcctt c

21

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

&lt;400&gt; 71

gaagtactct ccatacttaa gaaagg

26

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

&lt;400&gt; 72

ctgtgtcctt tcttaagtat ggagag

26

<210> 73  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H199L) of human histone deacetylase-1 (HDAC1) gene

<400> 73  
tctcggagcg ggtagttaac ag

22

<210> 74  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 74  
aaccagctg aacaacaaga tctg

23

<210> 75  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 75

ctcaaacttc ttggcaagct tcagac

26

<210> 76

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 76

tggtggtctg aagcttgcca agaag

25

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H134K, H135L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

<400> 77

cccgtcacca tggtggatgt c

21

<210> 78

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human

119/123

## histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

&lt;400&gt; 78

tgacattgac atccaccatg gtg

23

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

&lt;400&gt; 79

gaagtaattt ccgtacttaa ggaagg

26

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

&lt;400&gt; 80

tgtccttcct taagtacgga aattac

26

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial



120/123

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for creating a dominant negative mutant (H193L) of human histone deacetylase-3 (HDAC3) gene

&lt;400&gt; 81

gagcacaatg cacgtgggtt gg

22

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for amplifying RD3 sequence of human N-CoR gene

&lt;400&gt; 82

gggatccgtg aagtccttca gcctgctcc

29

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> PCR primer for amplifying RD3 sequence of human N-CoR gene

&lt;400&gt; 83

tgcggccgcc atgggtgagc ctctggaca

29

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 960

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(960)

<223> Corresponding to the sequence (+5281 to +6240) in the GenBank database  
(Accession: AF196971)

&lt;400&gt; 84

gcctctgtct cteccactcc acccctttcc tttctaccc tatccactc ctcgaggaat	60
catcctggc tcccacctca gtttcccgcc tccaaggcag catggcgggc aagaagtga	120
ggccactgtc cctgggtgtt cctaccccca caccctcacc ccaagacagc ctgttactgc	180
ggcgccaaca gccacggtcg cctacatctg ataagactta tctgctgcc cagggcaggc	240
cggagctggc gtaagcccca gtggggcgct aagtgagtgt gcccctgcct cccgccagca	300
ctggcctggc ctgcaggctt agcctgggtc atcaaggtat cccacaggct ctagttcaaa	360
tccagcagaa cctctctgag cctcactctt ctcacctgca aaatgggtac agccacatcc	420
cttctctccc tgcagccagg aagacgcaca tacacaggag tctagccac accggccccg	480
cacaaattaa gggctttact ctctgaaaag cccagtgaag tcatgaaacc atatctgcta	540
ttttcattta tcttggtttc agcctatttt gcttgtctgg aactacagt ccacgggagc	600
ctaggtcgag cgaggtccaa gaatccccag ggtgggcagg gaggttgaa gagggcctcc	660
agtgcccaag aggtgccccca caagcatggg acccgcccc tcccctggac tgccccaccc	720
actggggcac cagccactcc ctggggagga gggaggagg agaaggagg gagggaggga	780
gggaggaagg gagcctcaaa ggccaaggcc agccaggaca ccccctggga tcacactgag	840
cttgccacat cccaaggcg gccgaaccct ccgaaccac cagcccaggt cagtctcagc	900

122/123

ccccagagag cccccaccaa ggcaaccctg ggctgtctgc ccctaccctt atgcttgctc 960

<210> 85

<211> 720

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(720)

<223> Corresponding to the sequence (+2321 to +3040) in the GenBank database  
(Accession: AF196971)

<400> 85

gtacaaatgc catggggcct ggaccaagca ggggctctag aaccccagaa gatgccagga 60

gggagtgagc cagtcaggga aggcttccga gaagagagga cattgaagaa gagtctcaaa 120

cttaggcctg acggagaaga cgcgcggcca ggacacccca ccccgccct cgtctcccc 180

aaagcctgat ctggccccac tgattccctt atctgccac tccagctgc ctcttgctg 240

gctgaactgt cgccgcagac ttctgagcct gcgccccctc cacggggatg ggggagggaa 300

tggggtgagg cctggcctca cagcctcggg gtttccagct cttgctggag gcagggtct 360

ggggcgccct actcctcacc cttggcttct cttcctgagc gctctgtgct ctccagaaat 420

gaagaaatgg ggtgagtcca gcggccaaac ccttgctcctt gctcttagac atgcctcgag 480

cctgccattc cctgtgagga cagatttccc tatgttgcca ccgctgcttc taataataat 540

aatgatgatg ataattccca ttacagagc acaccattta tgggtgtgcca gcaggccctg 600

tgctgagtgg ttccctacca cgtggggggc taggacttta cccgttttcc agatgaagaa 660

123/123

actgaggctc agagggcgtc tggcccagga atcacacagc aaatcacaca gcaaatacaga 720

<210> 86

<211> 12

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(12)

<223> Palindrome sequence found on the 3' side of the GATA-E-box motif in promoter region of human GATA-1 gene

<400> 86

ctgtggccac ag

12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16895

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 9/14, C12Q1/34, 1/68, 1/02, A61K45/00,  
A61P37/06, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-90, 9/00-9/99, C12Q1/00-70, A61K45/00,  
A61P37/06, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JIOS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C.A. HASSING et al., A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression., Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 1998, 95, p.3519-24	14, 15
Y	A.H. WANG et al., HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDA1, Is a Transcriptional Corepressor., Molecular and Cellular Biology, 1999, p.7816-27	14, 15
E, A	WO 04/007758 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 January, 2004 (22.01.04), (Family: none)	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
24 February, 2004 (24.02.04)

Date of mailing of the international search report  
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16895

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 9/14, C12Q1/34, 1/68, 1/02, A61K45/00,  
A61P37/06, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-90, 9/00-9/99, C12Q1/00-70, A61K45/00,  
A61P37/06, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE(JIOS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C.A. HASSING et al., A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression., Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 1998, 95, p.3519-24	14,15
Y	A.H. WANG et al., HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDA1, Is a Transcriptional Corepressor., Molecular and Cellular Biology, 1999, p.7816-27	14,15
E,A	WO 04/007758 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 January, 2004 (22.01.04), (Family: none)	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
24 February, 2004 (24.02.04)

Date of mailing of the international search report  
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16895

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	W. FISCHLE et al., Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Mutiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT/N-CoR., Molecular Cell, 09 January, 2002 (09.01.02), pages 45 to 57	1-19
A	WO 00/08048 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 February, 2000 (17.02.00), (Family: none)	1-19
A	R.A. SHIVDASANI et al., A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in magakaryocyte growth and platelet development., EMBO J., 1997, 16(3), p.3965-73	1-19
A	I. TAKAHASHI et al., Selective Inhibition of IL-2 Gene Expression by Trichostatin A, a Potent Inhibitor of mammalian Histone Deacetylase., The Journal of Antibiotics, 1996, 49(5), p.453-7	1-19

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	W. FISCHLE, et al., Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. Molecular Cell, January 2002, 9, p.45-57	1-19
A	WO 00/08048 A1 (藤沢薬品工業株式会社) 2000.02.17 (ファミリーなし)	1-19
A	R. A. SHIVDASANI, et al., A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. EMBO J., 1997, 16 (13), p.3965-73	1-19
A	I. TAKAHASHI, et al., Selective Inhibition of IL-2 Gene Expression by Trichostatin A, a Potent Inhibitor of Mammalian Histone Deacetylase. The Journal of Antibiotics, 1996, 49 (5), p.453-7	1-19



## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (i)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 16, 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 16、17 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 1-19 の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特別ページを参照。

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願には以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料の一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲について作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する事項

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 請求の範囲 1、2、16-19

請求の範囲 1、2、16-19 に記載された「HDAC4 及び／又は HDAC8 選択的阻害剤」として、実施例等により、その機能を有することが示されているのは、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K、H803L、H863L) のみであり、これ以外の物質について何ら開示はなく、また、どのような物質が包含されるかが分からない。したがって、上記請求の範囲に記載された阻害剤については、明細書により十分な裏付けがなされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない、HDAC4 ドミナントネガティブ変異体 (H802K、H803L、H863L) 以外の物質に係る発明については、調査を行っていない。

## 請求の範囲 1-8、11-13、16-19

請求の範囲 1-8、11-13、16-19 に記載された方法において、HDAC 酵素活性阻害と、GATA-1 産生阻害、IL-2 産生阻害活性及び免疫担当細胞増殖阻害との関係が、実施例等により確認されているのは、HDAC4 についてのみであり、HDAC8 についてはそれらの関係は確認されていない。HDAC のアイソフォームでも、それぞれ活性が異なることを考えれば、HDAC4 の実験データを基に、HDAC8 が HDAC4 と同様の活性を有することは、当業者であっても予測し得ない。したがって、上記請求の範囲に記載された方法の HDAC8 に係る方法については、明細書により十分な裏付けがなされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない、HDAC8 に係る発明については、調査を行っていない。

## 請求の範囲 5-7、13

請求の範囲 5-7、13 に記載された方法において、HDAC4 酵素活性阻害と比較されるために用いられる HDAC アイソフォームの中で、その HDAC 酵素活性阻害と、GATA-1 産生阻害、IL-2 産生阻害活性及び免疫担当細胞増殖阻害との関係が、実施例等により確認されているのは、HDAC1 及び HDAC3 についてのみであり、HDAC2、HDAC5、HDAC6 及び HDAC7 についてはそれらの関係は確認されていない。HDAC のアイソフォームでも、それぞれ活性が異なることを考えれば、HDAC1 及び HDAC3 の実験データを基に、HDAC2、HDAC5、HDAC6 及び HDAC7 が、HDAC1 または HDAC3 と同様の活性を有することは、当業者であっても予測し得ない。したがって、上記請求の範囲に記載された方法の HDAC2、HDAC5、HDAC6 及び HDAC7 に係る方法については、明細書により十分な裏付けがなされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない、HDAC2、HDAC5、HDAC6 及び HDAC7 に係る発明については、調査を行っていない。

## 請求の範囲 8

請求の範囲 8 における「部分精製された酵素液」は、何を含んでいるか不明である。したがって、上記請求の範囲に記載された方法は、明細書により十分な裏付けがなされているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**